

SÉRIE A N° 1174

N° D'ORDRE :

2038

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Michel-Alexandre MACHEBŒUF

LAURÉAT DE L'INSTITUT

DOCTEUR EN MÉDECINE

ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE, A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES LIPIDES, LES STÉROLS ET LES PROTÉIDES
DU SÉRUM ET DU PLASMA SANGUINS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

6 DEC 1928

1928 devant la Commission d'examen

Président : MM. G. BERTRAND.

Examineurs { MAUGUIN.
MOUTON.

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1928

SÉRIE A N° 1174

N° D'ORDRE :

2038

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Michel-Alexandre MACHEBŒUF

LAURÉAT DE L'INSTITUT

DOCTEUR EN MÉDECINE

ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES LIPIDES, LES STÉROLS ET LES PROTÉIDES
DU SÉRUM ET DU PLASMA SANGUINS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **6 DEC 1928** devant la Commission d'examen

Président : MM. G. BERTRAND.

Examineurs { MAUGUIN.
MOUTON.

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1928

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*; Physique du globe.

Doyens honoraires.. P. APPELL, M. MOLLIARD.

<i>Profess. honoraires.</i>	J. BOUSSINESQ. A. JOANNIS. H. LE CHATELIER. H. LEBESGUE.	A. FERNBACH. A. LEDUC. R. DONGIER. E. HÉROUARD.
-----------------------------	---	--

<i>Professeurs</i>	EMILE PICARD..... Analyse supér. et algèbre supérieure. G. KOENIGS..... Mécanique physique et expérimentale. E. GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral. P. JANET..... Electrotechnique générale. F. WALLERANT... Minéralogie. H. ANDOYER..... Astronomie. P. PAINLEVÉ..... Mécanique anal. et mécanique céleste. GABRIEL BERTRAND..... Chimie biologique. Mme P. CURIE..... Physique générale et radioactivité. M. CAULLERY..... Zoologie (Evolution des êtres organisés) G. URBAIN..... Chimie minérale EMILE BOREL..... Calcul des probabilités et phys. mathém. L. MARCHIS..... Aviation. JEAN PERRIN..... Chimie physique. RÉMY PERRIER... Zoologie (Enseignement P. C. N.). H. ABRAHAM..... Physique. M. MOLLIARD..... Physiologie végétale. E. CARTAN..... Géométrie supérieure. L. LAPICQUE..... Physiologie générale. E. VESSIOT..... Théorie des fonct. et th. des transf. A. COTTON..... Physique générale. J. DRACH..... Application de l'analyse à la géométrie. CHARLES FABRY... Physique. CHARLES PÉREZ... Zoologie. LÉON BERTRAND... Géolog. structurale et géolog. appliquée. R. LESPIEAU..... Théories chimiques. E. RABAUD..... Biologie expérimentale. P. PORTIER..... Physiologie comparée. E. BLAISE..... Chimie organique. P.-A. DANGEARD.. Botanique. P. MONTEL..... Mécanique rationnelle. P. WINTREBERT... Anatomie et histologie comparées. O. DUBOSCO..... Biologie maritime. G. JULIA..... Mathématiques générales. A. MAILHE..... Etude des combustibles. L. LUTAUD..... Géogr. physique et géol. dynamique. EUGÈNE BLOCH... Physique théorique et phys. céleste. HENRI VILLAT... Mécanique des fluides et applications. CH. JACOB..... Géologie. P. PASCAL..... Chimie appliquée. N..... Chimie générale.
--------------------------	--



E. PECHARD... Chimie (Ens. P. C. N.). V. AUGER..... Chimie analytique. M. GUICHARD... Chimie minérale. A. GUILLET..... Physique. C. MAUGUIN... Minéralogie. L. BLARINGHEM Botanique. A. MICHEL-LÉVY Pétrographie. A. DEREIMS... Géologie. A. DENJOY..... Calcul diff. et int. H. BENARD..... Physique (P.C.N.). E. DARMOIS... Physique.	G. BRUHAT..... Physique. H. MOUTON..... Chimie physique. L. JOLEAUD..... Paléontologie. M. JAVILLIER... Chimie biologique. A. DUFOUR..... Physique (P. C. N.). F. PICARD..... Zoologie (Evolution des êtres organisés). ROBERT-LÉVY... Zoologie. L. DUNOYER... Optique appliquée. A. GUILLIERMOND Botanique (P.C.N.). A. DEBIERNE... Radioactivité.
---	--

Secrétaire..... DANIEL TOMBECK.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROUX

MEMBRE DE L'INSTITUT
MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
MEMBRE DE L'ACADÉMIE D'AGRICULTURE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. BERTRAND

MEMBRE DE L'INSTITUT
MEMBRE DE L'ACADÉMIE D'AGRICULTURE
PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES
CHEF DE SERVICE A L'INSTITUT PASTEUR

A MA MÈRE

A MA FEMME

MEIS ET AMICIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

ÉTUDE HISTORIQUE ET CRITIQUE

Recherches antérieures sur les phosphoaminolipides du sang.

C'est à CHEVREUL ⁽¹⁾ que revient le mérite d'avoir le premier (1823) constaté l'existence dans le sang d'une matière grasse phosphorée et azotée s'émulsionnant avec l'eau. Quelques années plus tard (1830) DENIS ⁽²⁾ a pu extraire, lui aussi, du sang des substances grasses phosphorées que LE CANU ⁽³⁾ identifia à celles isolées du sang par CHEVREUL et du cerveau par VAUQUELIN ; un peu plus tard d'ailleurs (1837) LE CANU ⁽³⁾ a nié la présence de graisse phosphorée dans le sérum, mais il fut contredit, deux ans après, dans un mémoire qu'il rapporta lui-même à la Société de pharmacie, par DENIS ⁽⁴⁾ qui retrouva dans le sang une graisse phosphorée (cérébrine).

C'est seulement en 1852 que la présence de la lécithine dans le sang fut définitivement démontrée par GOBLEY ⁽⁵⁾ qui parvint à isoler du sang une graisse phosphorée qu'il identifia à celle du cerveau et du jaune de l'œuf.

GOBLEY, pour extraire les « graisses » du sang, épuisait directement le sang par l'éther mais, en 1867, HOPPE-SEYLER ⁽⁶⁾ a

⁽¹⁾ CHEVREUL. *Annales du Muséum d'histoire naturelle*, 1823.

⁽²⁾ DENIS. Recherches expérimentales sur le sang humain (1830) ; mémoire rapporté à la Société de pharmacie par LE CANU. *Journ. Ph. et Chim.*, 17, 485 et 522 et 545 (1831).

⁽³⁾ LE CANU. Thèse Paris (1837), cité d'après un extrait dans *Journ. Ph. et Chim.*, 24, 38 (1838).

⁽⁴⁾ DENIS rapporté par LE CANU. *Journ. Ph. et Chim.*, 25, 224 (1839).

⁽⁵⁾ GOBLEY. *Journ. Ph. et Chim.*, 21, 241 (1852).

⁽⁶⁾ HOPPE-SEYLER. *Med. Chem. Untersuchungen* (1867), cité d'après M. LAUDAT. Thèse pharmacie. Paris, 1913.

montré qu'une partie des graisses phosphorées résiste à l'extraction directe du sang par l'éther; cet auteur s'est ensuite appliqué à chercher une autre méthode d'extraction et, dans la quatrième édition de son traité d'analyse ⁽¹⁾, il proposa de traiter le sang d'abord par de l'alcool, puis de faire une lixiviation prolongée du coagulum par l'éther et de rassembler les liquides alcooliques et étherés. La méthode de HOPPE-SEYLER fut longtemps utilisée, mais de nombreux auteurs constatèrent que pour obtenir la totalité des substances solubles dans l'alcool ou l'éther, il était nécessaire de renouveler à maintes reprises les liquides d'extraction; pour faciliter ces opérations furent proposés des appareils tels que ceux bien connus de ZULKOWSKI ⁽²⁾ et de SOXHLET ⁽³⁾ qui furent ultérieurement modifiés ou perfectionnés par BERNTROP ⁽⁴⁾ puis par KUMAGAWA et SUTO ⁽⁵⁾ dans le but de pratiquer la lixiviation du coagulum par des solvants plus chauds; on put ainsi parvenir à une extraction satisfaisante des substances solubles dans l'alcool ou l'éther ⁽⁶⁾. Les grandes difficultés ainsi rencontrées pour extraire ces substances ont fait soupçonner une union assez intime de la lécithine avec les protéides; on proposa même des noms pour désigner ces combinaisons (lécithalbumines, lécitho-protéines, etc.); cette hypothèse fut très discutée et de nombreuses études furent entreprises sur la question; il est impossible de les citer toutes ici ⁽⁷⁾; certains auteurs s'attachèrent à l'étude des propriétés physicochimiques des émulsions aqueuses de lécithine, pensant, par ces propriétés, pouvoir rendre compte des phénomènes constatés avec le sang ou le sérum; d'autres savants cherchèrent à reproduire, *in vitro*, des combinaisons de protéides et de lécithine ou de lécithine et de cholestérol. Toutes ces recherches conduisirent à des résultats souvent contradictoires et rarement très concluants.

(1) HOPPE-SEYLER. *Traité d'analyse chimique appliquée à la physiologie*, 4^e édition, traduction française par SCHLAGDENHAUFEN. Paris, 1877.

(2) ZULKOWSKI. *Dingler's polytech. journal*, 1873, p. 298.

(3) SOXHLET. *Dingler's polytechn. journal*, 1879, p. 461.

(4) BERNTROP. *Zeitsch. f. angew. chem.*, p. 122 (1902).

(5) KUMAGAWA et SUTO. *Biochem. Zeitsch.*, 8, 213, 347 (1908).

(6) Une bonne étude critique de toutes les méthodes d'extraction et de dosage a été faite par M. LAUDAT. *Thèse pharm. Paris*, 1913.

(7) On peut trouver une bibliographie assez complète de la question dans l'excellente revue de P. A. LEVENE et I. P. ROLF. *Physiological reviews*, 1, 327-393 (1921).

I. — Etudes sur les propriétés physicochimiques
des émulsions aqueuses de phosphoaminolipides.

THUDICUM (1901) constata que la lécithine se gonfle dans l'eau et se divise en une suspension laiteuse filtrable ; cette étude fut étendue en 1903 par W. KOCH ⁽¹⁾ qui montra que les alcalis rendent les suspensions plus stables et moins louches tandis que les acides précipitent les phospholipides. KOCH étudia en outre l'action précipitante des sels et parvint aux conclusions suivantes : 1° Les sels des métaux monovalents sont sans action. 2° Les sels des métaux bivalents précipitent. 3° Les sels des métaux trivalents ne précipitent pas la lécithine de ses émulsions et même la protègent de la précipitation par les sels de métaux bivalents. 4° Les non électrolytes : sucre, albumine, albumoses, etc. n'ont pas de pouvoir précipitant sensible.

PORGES et NEUBAUER ⁽¹⁾ en 1908 confirmèrent et étendirent les résultats de KOCH en ce qui concerne les métaux di et trivalents, mais montrèrent que les sels des métaux monovalents ont aussi un pouvoir précipitant qui se manifeste seulement pour des concentrations salines moyennes, mais pas pour les trop fortes ni les trop faibles concentrations ; ce fait avait échappé à KOCH qui opérait avec des solutions trop concentrées. PORGES et NEUBAUER, dans le même mémoire ⁽²⁾, rapportent des expériences sur l'influence du sérum de cheval sur les suspensions de lécithine d'après lesquelles ils concluent à un rôle de « colloïdes protecteurs » (Schutzkolloïde) des protéides sériques vis-à-vis de la lécithine ; on doit, à ce sujet, remarquer que leur conclusion est un peu hâtive car : 1° Ils opérèrent avec du sérum simplement dilué ou dialysé et non avec des protéides purifiés. 2° Leurs expériences sont peu nombreuses et peu concluantes et ne se rapportent qu'à la protection contre la précipitation par les chlorures de calcium et de sodium. On doit de plus remarquer que toutes les émulsions lécithine-albumine obtenues par PORGES et NEUBAUER étaient laiteuses, même pour de faibles concentrations en lécithine, tandis que le sérum ou le plasma peuvent

⁽¹⁾ W. KOCH. *Zeitsch. f. physiol. chem.*, 37, 181 (1903).

⁽²⁾ PORGES et NEUBAUER. *Biochem. Zeitschr.*, 7, 152-177 (1908).

être parfaitement limpides même pour de très hautes teneurs en lécithine.

Des « solutions » aqueuses de phospholipides presque aussi limpides que le sérum furent obtenues, la même année (1908), par LONG et GEPHART ⁽¹⁾ par l'union *in vitro* de la lécithine aux sels biliaries ; ces auteurs ont, en effet, démontré qu'une émulsion aqueuse louche de lécithine se clarifie par addition de sels biliaries en proportion telle qu'il n'y ait pas plus de 80 parties de lécithine pour 100 parties de sels biliaries. Les solutions aqueuses ainsi obtenues sont assez stables et ne se décomposent pas, par exemple, pour livrer leur lécithine à de l'éther. LONG et GEPHART (*loc. cit.*) ont également étudié les propriétés des émulsions de lécithine dans l'eau pure et trouvé que, contrairement aux affirmations de PORGES et NEUBAUER (*loc. cit.*), il ne semble pas y avoir de relation nette entre le pouvoir précipitant des sels et les valences de leurs ions ; ils montrèrent de plus que l'éther n'enlève que très difficilement la lécithine des émulsions aqueuses en l'absence de sels, mais très facilement en présence de sels en quantités convenables.

De nombreuses études ont été effectuées depuis sur les propriétés des émulsions de lécithine, une des plus complètes et des plus récentes est celle publiée en 1921 par HATTORI ⁽²⁾. Cet auteur étudia particulièrement le gonflement de la lécithine dans l'eau et son passage à l'état d'émulsion : si l'on humecte une préparation de lécithine et que l'on mette au point, à l'ultra-microscope, le bord de cette préparation, on voit de nombreuses protubérances qui grossissent peu à peu, « la lécithine se gonfle ». Si la quantité d'eau est suffisante, la lécithine gonflée se divise, d'elle-même, en petites boules microscopiques et innombrables dont les plus petites présentent un mouvement brownien très actif. Si l'on met un morceau de lécithine au fond d'un verre conique puis que l'on verse dessus un peu d'eau et laisse le tout en repos, le gonflement maximum est atteint en quelques heures. Si l'on évite toute agitation la lécithine gonflée demeure, sous la forme de petits globules, au fond du verre, mais la moindre agitation provoque alors l'établissement d'une émulsion stable. Si l'on répète l'ex-

⁽¹⁾ J. H. LONG et F. GEPHART. *Am. chem. Soc.*, **30**, 881-902 (1908) et **30**, 1312-1319 (1908).

⁽²⁾ K. HATTORI. *Bioch. Zeitschr.*, **119**, 47 (1921).

périence avec diverses solutions de chlorure de sodium, on constate que le degré de gonflement est d'autant plus faible que la concentration saline est plus forte, mais tant que cette concentration reste au-dessous de 3 p. 100, la dispersion de la lécithine en émulsion stable est facilement provoquée. Si, au contraire, la concentration saline est plus élevée il faut une agitation énergique pour provoquer la formation d'une émulsion et cette émulsion n'est pas stable, la lécithine se dépose rapidement au fond du vase. Dans une solution de chlorure de sodium à 5 p. 100, par exemple, on peut encore noter au microscope un gonflement très important de la lécithine, mais la formation d'émulsions stables est absolument impossible ; le gonflement est donc encore très net lorsque la concentration saline est suffisante pour flocculer les émulsions de lécithine.

HATTORI étudia de plus avec grand soin les conditions de stabilité des mélanges lécithine-cholestérol, nous reviendrons plus loin sur cette partie de son travail.

II. — Etudes sur les propriétés physico-chimiques des mélanges lécithine-protéides.

HOPPE-SEYLER ⁽¹⁾, LIEBERMANN ⁽²⁾, OSBORNE et CAMPBELL, et d'autres auteurs ont décrit des substances extraites du foie, du rein, du cerveau, de l'estomac ou de l'œuf contenant des protéides et des phospholipides, insolubles dans l'eau pure et les acides dilués, solubles dans les alcalis dilués et dans certaines solutions de sels neutres. De ces substances, dénommées lécithalbumines, il est impossible d'extraire complètement les lipides, à froid, par les solvants habituels des lipides et, même après de nombreux épuisements par de l'éther, il reste des phospholipides liés aux protéides. En se basant sur ces faits, on admit généralement alors que ces substances étaient des combinaisons chimiques vraies, mais A. MAYER et F. TERROINE ⁽³⁾ ont depuis nié l'existence d'une liaison chimique entre phospholipides et protéides et montré que, par mélange en proportions convenables d'émulsions aqueuses

⁽¹⁾ HOPPE-SEYLER. *Hoppe-Seyler Med. Chem. Untersuch.*, 2, p. 215 (1867).

⁽²⁾ LIEBERMANN. *Arch. f. ges. Physiol.*, 54 p. 573 (1893).

⁽³⁾ A. MAYER et F. TERROINE. *C. R. Soc. Biol.*, 62, p. 317 (1907).

de lécithine et de sols alcalins d'albumine on obtient des émulsions assez homogènes et assez stables, précipitables par acidification et présentant la plupart des propriétés des lécithalbumines extraites des organes animaux.

Bien que contestées partiellement par HANDOWSKY et WAGNER⁽¹⁾ les expériences de MAYER et TERROINE sont, dans leur ensemble, faciles à reproduire.

J. FEINSCHMIDT⁽²⁾ en 1911 montra que les émulsions aqueuses de lécithine étaient sensibles aux variations de la réaction du milieu, la lécithine émulsionnée présente un point isoélectrique situé près de pH 3. Pour une telle acidité la stabilité des émulsions est à son minimum. FEINSCHMIDT montra de plus que, par mélange d'une suspension de lécithine et d'un sol d'albumine, on obtient un ensemble dont le point isoélectrique est différent de celui de la lécithine et aussi de celui du protéide utilisé; l'optimum de précipitation par les sels est modifié, mais cela n'explique pas encore d'une façon satisfaisante en tout point l'état physique de la lécithine dans le sérum, car les émulsions mixtes de FEINSCHMIDT sont laiteuses, instables en présence de quantités de sel voisines de celles que l'on rencontre dans les sérums et sont quantitativement précipitées par le sulfate d'ammonium à demie saturation. Dans le sérum, au contraire, on ne perçoit, en général, aucune opalescence et, même par addition de sulfate d'ammonium jusqu'à demie saturation on ne précipite qu'une très faible fraction des phospholipides (voir expériences ci-dessous).

Recherches antérieures sur le cholestérol sanguin.

L'existence du cholestérol dans le sang fut entrevue en 1831 par LE CANU⁽³⁾ et aussi par DENIS⁽⁴⁾ qui rapportèrent avoir isolé du sang une « matière grasse cristallisable nacrée » fondant vers 150° C. Deux ans plus tard BOUDET⁽⁵⁾ identifia cette substance

⁽¹⁾ H. HANDOWSKY et R. WAGNER. *Biochem. Zeitschr.* 31, pp. 32 à 45 (1911).

⁽²⁾ J. FEINSCHMIDT, *Die Säureflockung von Lecithinen und Lecithineveiszmissionen*, *Biochem. Zeitschr.*, 38, pp. 244 à 251 (1912).

⁽³⁾ LE CANU. *Journ. Ph. Ch.*, 17, pp. 485-545 (1831).

⁽⁴⁾ DENIS. Recherches expérimentales sur le sang humain (1830) rapporté à la Société de pharmacie par LE CANU. *Journ. Ph. Ch.*, 17, pp. 485, 522, 545 (1831).

⁽⁵⁾ BOUDET. *Journ. Ph. Ch.*, 19, p. 291 (1833).

à la « cholestéarine » isolée du cerveau par CHEVREUL ; BOUDET isola de plus du sérum une substance nouvelle cristallisée, fondant vers 36°, très soluble dans l'éther, peu soluble dans l'alcool froid et plus soluble dans l'alcool chaud qu'il dénomma « séroline », cette substance était, on l'a su depuis, un mélange d'esters de cholestérol.

Le cholestérol et la séroline furent retrouvés en 1830 par DENIS ⁽¹⁾ dans le sang normal.

BEQUEREL et RHODIER, en 1844 ⁽²⁾ tentèrent le dosage du cholestérol et de la séroline dans le sang.

GOBLEY ⁽³⁾, en 1852 montra que la « séroline » de BOUDET contenait du cholestérol et des acides gras, mais il crut qu'elle était un simple mélange de glycérides et de cholestérol.

HOPPE-SEYLER ⁽⁴⁾ en 1866 constata la présence du cholestérol dans le sérum et aussi dans les globules sanguins.

Ce fut COMMAILLE ⁽⁵⁾, en 1875, qui préconisa la saponification par les alcalis fixes pour séparer quantitativement le cholestérol des autres substances contenues dans l'extrait éthéroalcoolique.

C'est seulement en 1895 que HÜRTLE ⁽⁶⁾ découvrit dans le sérum les esters oléique et palmitique du cholestérol ; la séroline de BOUDET était un mélange de ces esters que GOBLEY avait pris, on l'a vu, pour un mélange de cholestérol et de glycérides.

Par les travaux de LETSCHE ⁽⁷⁾ ont eut enfin, en 1907, la démonstration de l'existence dans le sérum de cholestérol libre à côté des esters de cholestérol.

Tous les physiologistes admettent que le cholestérol sanguin doit jouer un rôle biologique de première importance, mais peu de choses sont à ce jour certaines sur ce sujet ; on n'a pas encore pu d'ailleurs déterminer avec certitude l'état physique du

(1) DENIS. Essai sur l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang humain (1838) rapporté à la société de pharmacie par LE CANU. *Journ. Ph. Ch.*, 25, p. 224 (1839).

(2) BEQUEREL et RHODIER. Recherches sur la composition du sang dans l'état de santé et de maladie, Paris (1844), cité d'après Laudat (*Thèse Phar. Paris*, 1913).

(3) GOBLEY. *Journ. Ph. Ch.*, 21, p. 241 (1852).

(4) HOPPE-SEYLER. *Med. Chem. Untersuchungen*, 1876, pp. 133-150, 169-208, 366-383, 523-550.

(5) COMMAILLE. *Journ. Ph. Ch.*, 22, p. 442 (1875).

(6) HÜRTLE. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 21, p. 331 (1895).

(7) LETSCHE, *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 53, pp. 31-112 (1907).

cholestérol dans le sérum, ni trouver des preuves définitives de l'existence de liaisons chimiques entre le cholestérol (ou ses esters) et les autres constituants du sérum.

Depuis longtemps déjà on a remarqué qu'il est impossible d'extraire la totalité du cholestérol du plasma ou du sérum par simple agitation avec de l'éther ou de la ligroïne et depuis les travaux de HARDY ⁽¹⁾, de HASLAM ⁽²⁾, de CHICK ⁽³⁾ et de HARTLEY ⁽⁴⁾, on a pu entrevoir la possibilité de liaisons entre les protéides et les constituants éthersolubles du plasma.

BANG ⁽⁵⁾ fut le premier à soutenir que le cholestérol du sérum est probablement combiné aux protéides et, parmi ces protéides, il attribua ce rôle aux globulines.

HANDOWSKY, LOHMANN et BOSSE ⁽⁶⁾ ont effectué de nombreux dosages de cholestérol dans des sérums de bœufs et trouvé qu'avec les globulines se précipite une assez forte proportion du cholestérol du sérum. Ils conclurent à une affinité spéciale des globulines pour le cholestérol et pensèrent mesurer cette affinité en mesurant la quantité de cholestérol résistant à l'extraction par l'éther. Ces auteurs pensèrent aussi pouvoir trouver une relation entre la teneur en albumine des sérums et la quantité de cholestérol se laissant extraire par l'éther; ils conclurent ainsi : plus la teneur en albumine est grande, plus grande est la quantité de cholestérol que parvient à enlever l'éther; se basant sur des chiffres très discordants, ils ont tracé une courbe reliant la teneur en albumine et la quantité de cholestérol se laissant extraire par l'éther, mais le simple examen de leur schéma permet de constater qu'aux points obtenus expérimentalement on peut aussi bien faire correspondre des courbes très différentes; on peut aussi logiquement déduire de leurs expériences qu'il n'existe aucune relation entre ces deux quantités, mais l'approximation de leurs méthodes expérimentales ne permet pas même une telle conclusion. Sans aucun appui expérimental, ces auteurs

⁽¹⁾ HARDY. *J. Physiol.*, 33, p. 251 (1905).

⁽²⁾ HASLAM. *Biochemical Journ.*, 7, p. 492 (1913).

⁽³⁾ CHICK. *Biochemical Journ.*, 8, p. 404 (1914).

⁽⁴⁾ HARTLEY. *Brit. Journ. Exper. Pathol.*, 6, p. 180 (1915).

⁽⁵⁾ BANG. *Biochemische Zeit.*, 90, p. 383 (1918).

⁽⁶⁾ HANDOWSKY (et divers collaborateurs), une suite d'articles : Untersuchungen über die Zusammensetzung des Blutserums und ihre Bedeutung für Giftwirkungen. *Arch. f. die gesamte Physiologie*, 240, pp. 35 à 69 (1925) (et tout particulièrement le dernier article pp. 62 à 69 par Handowsky, Lohmann et Bosse).

ont de même admis que le reste du cholestérol du sérum est lié aux phospholipides. De leur travail se dégage cependant un fait intéressant : le quart environ du cholestérol total du sérum est assez énergiquement lié aux globulines et se précipite avec elles par le sulfate d'ammonium, mais ils n'ont pas cherché s'il s'agissait de cholestérol libre ou à l'état d'esters.

E. G. YOUNG ⁽¹⁾ se basant sur des mesures polarimétriques dit que les esters cholestériques sont associés de façon lâche à la sérum-albumine.

N. TROENSEGAARD et B. KOUDAH ⁽²⁾ étudièrent la dégradation des protéides du sérum par acétylation au moyen de chlorure d'acétyle et d'anhydride acétique à 110° C.; ils obtinrent d'intéressants résultats sur la constitution des protéides, puis en poursuivant ce travail ⁽³⁾ ils isolèrent des produits dérivant de l'acétylation de la sérum-globuline des hydrocarbures ($C^{16}H^{28}$ et $C^{16}H^{32}$) analogues à certains de ceux produits par l'acétylation du cholestérol dans des conditions semblables; n'obtenant ces carbures qu'en plus faible quantité à partir de la sérum-albumine ou de la globine, ils conclurent que le cholestérol est un groupement prosthétique de la sérum-globuline et seulement une impureté dans les cas de l'albumine et de la globine. Cette conclusion est peut être un peu hâtive car ils ne cherchèrent pas si, par une purification plus poussée des divers protéides, ces carbures persistent bien en même proportion dans les produits d'acétylation des globulines et disparaissent des produits d'acétylation des autres protéides sériques.

Quoiqu'il en soit, ces résultats expérimentaux ne sont qu'un argument en faveur de l'existence du cholestérol dans la molécule même des globulines et non une preuve certaine car les carbures se sont peut-être formés aux dépens de groupements cycliques autres que le cholestérol.

TROENSEGAARD et KOUDAH ont fait, d'autre part, incidemment, (*loc. cit.*, page 105) une très intéressante constatation : après avoir séparé la sérum-albumine par filtration après cristallisation (à pH 4,8 en présence de sulfate d'ammonium) ils ont voulu

⁽¹⁾ E. G. YOUNG. *Proc. Royal Soc. Lond.*, B 93, p. 15 (1922).

⁽²⁾ N. TROENSEGAARD et B. KOUDAH. Die acetylierung der Proteine des Blutes. *Zeitschrift. f. physiol. chem.*, 153, pp. 93 à 110 (1926).

⁽³⁾ N. TROENSEGAARD et B. KOUDAH. Cholesterin als prostetische grupe im Serum-globuline. *Zeits. f. physiol. chemie*, 153, pp. 111-118 (1926).

remettre cette albumine en solution dans de l'eau pure; ils constatèrent qu'il restait sur le filtre une petite quantité d'une substance verdâtre insoluble (ungelösten grünlichen Stoff) contenant de la lécithine et du cholestérol, ils ne l'étudièrent pas autrement car leur but était tout autre : obtention d'albumine assez pure pour étudier son acétylation.

A peu près à la même époque, THEORELL ⁽¹⁾ a étudié la séparation des divers protéides du plasma et constaté que les précipités protéidiques obtenus par addition progressive de sulfate d'ammonium contenaient des phospholipides et du cholestérol et que le cholestérol était en majeure partie entraîné par l'ensemble des précipités protéidiques; THEORELL constata en particulier que le rapport du cholestérol au phosphore lipidique était 20,3 dans le fibrinogène, 16,9 dans les globulines et 9,7 dans la sérum-albumine.

Ces résultats sont en contradiction partielle avec ceux de WACKER et HUECK ⁽¹⁾; ces auteurs ont, en effet, montré que la fibrine très purifiée préparée avec tout le soin nécessaire à partir du sang de cheval ne contient pas de cholestérol tandis que les préparations commerciales de fibrine en contiennent de petites quantités.

Tout dernièrement, longtemps d'ailleurs après le début du travail faisant l'objet du présent mémoire, il est paru, en 1927, un article de GARDNER et GAINSBOROUGH ⁽²⁾ dans lequel sont exposés quelques résultats intéressants. Dans le plasma humain normal, le cholestérol est partiellement entraîné par les divers protéides lors de leur précipitation par le sulfate d'ammonium et ce, dans les proportions suivantes :

Les résultats sont calculés pour 100 parties de ce qui se trouvait dans le plasma étudié.

	Cholestérol libre	Cholestérol estérifié	Cholestérol total
Euglobuline	22,6 0/0	44,0 0/0	45,0 0/0
Pseudoglobuline.	47,8 0/0	16,3 0/0	46,8 0/0
Albumine.	48,5 0/0	46,8 0/0	47,4 0/0
Total			79,2 0/0
Cholestérol non retrouvé .			20,8 0/0

⁽¹⁾ THEORELL. *Biochem. Zeit.*, 175, p. 297 (1926).

⁽²⁾ J. A. GARDNER et H. GAINSBOROUGH. Sterols and proteins. *Biochem. Journal*, 21, pp. 141 à 147 (1927).

En étudiant plus particulièrement un échantillon d'un plasma humain qu'ils avaient pu se procurer en assez grande abondance, ces auteurs ont de plus constaté un phénomène assez comparable à celui déjà entrevu par TROENSEGAARD et KOUHAHL (voir ci-dessus). En voulant remettre en solution dans de l'eau pure les précipités protéïdiques, préalablement recueillis sur des filtres, il reste sur chacun des filtres de petites quantités d'une substance insoluble; ils dosèrent le cholestérol dans les papiers filtres imprégnés de cette substance et trouvèrent que les quatre cinquièmes environ du cholestérol total du plasma restaient ainsi sur les filtres; ils ne poussèrent pas plus avant cette étude.

De tous ces nombreux travaux ne se dégage aucune conclusion précise sur l'état du cholestérol dans le sérum ou le plasma.

On ne peut pas admettre sans autre démonstration que le cholestérol est à l'état libre en suspension dans le sérum car, ainsi que l'ont constaté GARDNER et GAINSBOROUGH (*loc. cit.*), les émulsions de cholestérol même beaucoup moins riches en cholestérol que le sérum sont quantitativement précipitées par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, tandis que, dans le sérum, plus des deux tiers du cholestérol restent dans les eaux-mères des globulines lors de leur précipitation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

On ne peut pas non plus, sans une étude plus complète, admettre ou nier une liaison du cholestérol avec les protéïdes ou les phospholipides du sérum. Le sérum peut être parfaitement limpide et contenir près de deux grammes de cholestérol total par litre; or il est impossible, actuellement du moins, d'obtenir des suspensions aqueuses limpides, même en présence de protéïdes, même pour des concentrations bien inférieures en cholestérol.

Certains auteurs ont pensé à une liaison du cholestérol et des lipides du sérum; quelques recherches ont donc été entreprises sur les propriétés physicochimiques des mélanges de lipides et de cholestérol; voici le résumé des principales parmi ces recherches.

**Recherches sur les propriétés physicochimiques
des mélanges de cholestérol et de lipides.**

La lécithine, nous l'avons vu, gonfle dans l'eau et s'y divise en une suspension laiteuse homogène et filtrable. Le cholestérol ne se laisse pas ainsi diviser par l'eau mais donne cependant dans certaines conditions des suspensions assez stables. PORGES et NEUBAUER ⁽¹⁾ firent en 1908 une étude assez soignée des suspensions aqueuses de cholestérol ; pour obtenir ces suspensions ils versèrent, par petites portions, dans de l'eau, une solution acétonique de cholestérol en agitant énergiquement après chaque addition nouvelle de la solution acétonique ; ils chassèrent l'acétone (par évaporation sur un bain-marie bouillant) dès que la teneur devenait trop élevée. Il se forme toujours quelques flocons, mais après filtration on obtient ainsi, en effet, des suspensions laiteuses assez stables, mais facilement précipitables par les sels $(\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2 \text{ 0,2 N})$.

En présence de lécithine ou d'albumine on peut avoir des suspensions mixtes un peu plus stables et PORGES et NEUBAUER attribuent à ces substances le rôle de « colloïde protecteur » (Schutzkolloide).

En 1908 également, WHITE ⁽²⁾ étudia les mélanges de cholestérol et d'acides gras, il conclut à l'existence de combinaisons lâches différentes des esters. Ces combinaisons instables pourraient d'après WHITE former, dans certaines conditions, des cristaux liquides tout comme certains esters de cholestérol ; dans cet état, les combinaisons lâches d'acides gras et de cholestérol pourraient donner avec l'eau des formes de myéline analogues, en certains points, à celles données par la lécithine se gonflant dans l'eau ou par le cholestérol se gonflant dans des solutions de savons alcalins. Les émulsions de cholestérol et d'acide gras, en combinaisons lâches, obtenues par WHITE laissent se déposer, par repos prolongé, leurs deux constituants, cholestérol et acides gras, à l'état cristallisé. WHITE ajoute que de semblables combinaisons lâches peuvent se former entre le

⁽¹⁾ O. PORGES et E. NEUBAUER. *Biochem. Zeitsch.*, 7, p. 152-177 (1908).

⁽²⁾ C. P. WHITE. *Proc. of the Physiol. Soc. VI. in the Journal of Physiology*, 38 (1908).

cholestérol et la lécithine, il pense en outre que c'est sous la forme de telles combinaisons lâches avec les acides gras ou avec la lécithine, à l'état de cristaux liquides, que le cholestérol existe normalement dans les tissus animaux. PARTINGTON ⁽¹⁾, en 1911, a nié l'existence de toute combinaison autre que les esters-entre le cholestérol et les acides gras. Ce résultat contredit entièrement ceux de WHITE, mais il faut remarquer que PARTINGTON opérait différemment et étudiait seulement les courbes de solidification lente des mélanges fondus de cholestérol et d'acides gras ; il ne perçut aucune phase liquide anisotrope et ne rencontra pas d'autre forme cristalline que celles des acides gras et du cholestérol ; les courbes étaient très régulières et correspondaient aux courbes de solidification d'un mélange binaire simple avec eutectique. On peut objecter à PARTINGTON que par sa méthode de cristallisation très lente par baisse très progressive de la température et agitation continuelle, il avait peu de chances de percevoir les états métastables mais seulement les états stables ; or jamais WHITE (*loc. cit.*) ni MOORE ⁽²⁾, qui étudièrent les combinaisons lâches de cholestérol et d'acides gras, ne pensèrent que ces combinaisons étaient des états stables. Je n'ai pas trouvé d'autre travail sur cette question, elle est donc à reprendre.

En 1921 HATTORI ⁽³⁾ étudia avec grand soin les propriétés physicochimiques des mélanges de lécithine et de cholestérol dans le but de savoir à quel état se trouvent dans la cellule vivante le cholestérol et la lécithine. Voici un résumé de ses expériences et de ses conclusions : Un mélange optiquement homogène de cholestérine et de lécithine est obtenu en laissant s'évaporer sur une lamelle couvre-objet une goutte d'une solution dans l'alcool absolu de une partie de cholestérol et de 1,5 partie de lécithine pour 200 parties d'alcool absolu. En évitant l'hydratation par l'atmosphère on obtient ainsi assez facilement des préparations homogènes et une lamelle ainsi préparée apparaît, à l'ultramicroscope optiquement homogène ; souvent, il est vrai, on y voit de petits points blanc grisâtre ultramicroscopiques, à

(¹) J. PARTINGTON. *Chem. Soc.*, **99**, p. 313-318 (1911).

(²) F. C. MOORE. *Medical. chron.*, 1908, p. 204.

(³) K. HATTORI. Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse. III. Ultramikroskopische Untersuchungen an Lipoiden. *Biochem. Zeitschrift*, **119**, p. 45-64 (1921).

peine visibles, répartis uniformément ; ces petits points ne sont, au dire de l'auteur, pas autre chose que des-submicrons de cholestérol qui se forment lorsqu'on laisse la solution alcoolique s'évaporer trop lentement, ce ne sont point des microcristaux mais des particules colloïdales. Pour essayer de mettre en évidence la solubilité du cholestérol dans la lécithine, HATTORI accole deux lamelles préparées ainsi : sur la première une mince lamelle de lécithine légèrement gonflée par un demi-volume d'eau, sur la deuxième lamelle des microcristaux de cholestérol obtenus par évaporation d'une solution alcoolique diluée de cholestérol. Par contact des deux lamelles on voit, à l'ultramicroscope, les petits cristaux de cholestérol s'évanouir presque complètement en laissant seulement des empreintes à peine visibles qui semblent constituées par de très petits points qui se dispersent très lentement. HATTORI conclut ainsi :

La lécithine et le cholestérol forment un système dans lequel le cholestérol est une phase dispersée dans le milieu de dispersion lécithine ; le système est le même, qu'il soit obtenu par mélange du cholestérol et de la lécithine ou de leurs solutions alcooliques.

HATTORI étudia aussi au moyen de l'ultramicroscope l'action de l'eau et des solutions salines sur les mélanges de lécithine et de cholestérol ; pour cela il mit en contact une parcelle du mélange homogène lécithine-cholestérol avec de l'eau distillée et constata qu'après quelques minutes partent du bord de la masse de petites parcelles de lécithine gonflée qui se mettent en suspension tantôt sous forme de boulettes, tantôt sous forme de filaments (formes dites de myéline) ; ces parcelles de lécithine gonflée apparaissent peu éclairées, mais autour d'elles dansent énergiquement de nombreuses particules de cholestérol très brillantes ; parfois même on voit certaines de ces particules brillantes de cholestérol danser au sein même des globules de lécithine gonflée. Il y a eu séparation du cholestérol et de la lécithine en deux phases distinctes sous l'influence du gonflement de la lécithine par l'eau. Pour caractériser ce phénomène, HATTORI emploie le terme « Entmischung » que l'on peut traduire à peu près par « démêlage ». Le gonflement de la lécithine est influencé par les sels neutres, aussi HATTORI a-t-il reproduit cette expérience avec des solutions salines de concentrations diverses. Si par

exemple on remplace l'eau distillée par une solution à 8 gr. 5 de chlorure de sodium par litre, l'aspect final est très différent ; dans ce cas aussi de petites boulettes de lécithine gonflée se mettent en suspension mais elles sont beaucoup plus brillantes que dans l'expérience précédente et ni autour d'elles ni dans leur intérieur ne s'aperçoit aucune parcelle de cholestérol.

En d'autres termes, sous l'influence de solutions salines convenables, il ne se fait plus de séparation du cholestérol et de la lécithine (Entmischung) ; les solutions « physiologiques » de chlorure de sodium ne divisent pas comme l'eau pure le mélange homogène lécithine-cholestérol en ses constituants, le gonflement de la lécithine est moins important qu'avec l'eau pure et le mélange homogène persiste ; par l'eau ou les solutions salines hypotoniques la lécithine gonfle trop, sa consistance devient tellement faible que le cholestérol s'en sépare sous forme de parcelles qui s'animent du mouvement brownien.

De ces faits HATTORI se sert pour émettre une hypothèse sur l'état du cholestérol et de la lécithine dans les globules rouges et leur rôle dans l'hémolyse par hypotonie.

Nous intéressant particulièrement à la question de l'état du cholestérol et de la lécithine dans le plasma et le sérum nous devons considérer les intéressants résultats d'HATTORI d'un point de vue différent : une semblable union physique de la lécithine et du cholestérol n'explique pas la limpidité du sérum ni l'absence de précipitation de ces substances avec les globulines par le sulfate d'ammonium car les émulsions préparées *in vitro* par HATTORI sont laiteuses et sont précipitées par les solutions hypertoniques.

Aucun des travaux dont il nous fut possible de trouver mention dans les divers mémoires ne donne donc une explication satisfaisante sur l'état du cholestérol dans le plasma ou le sérum.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Recherches expérimentales sur les lipides, les stérols et les protéïdes du sérum et du plasma sanguins.

Nous avons vu qu'aucune des recherches antérieures ne donne d'explication entièrement satisfaisante de l'état physicochimique des phospholipides, des stérols et des stérides du plasma et du sérum; c'est à cette question que nous avons essayé d'apporter une contribution expérimentale en étudiant le fractionnement des protéïdes du sérum dans le but de voir dans quelles fractions se rassemblent les lipides et les stérols et, dans la suite de ce travail, il a été extrait, par une longue série de fractionnements, une substance rappelant par certaines propriétés les lécithalbumines des auteurs cités ci-dessus (LIEBERMANN, HOPPE-SEYLER, OSBORNE et CAMPBELL) constituée par des phospholipides, des stérides et des protéïdes. Cette substance diffère nettement des complexes colloïdaux produits *in vitro* par MAYER et TERROINE en 1907 (*loc. cit.*) et par FEINSCHMIDT ⁽¹⁾ en 1912.

Sans prétendre, en aucune façon, à la qualité de corps défini, cette substance présente des propriétés physiques très particulières qui aideront peut-être à éclaircir certains faits obscurs du métabolisme des lipides. Miscible en toute proportion avec l'eau neutre, donnant des sols ou des gels parfaitement limpides, elle est formée, pour près de 50 0/0 par des lipides et sa solubilité est telle qu'il est possible d'obtenir des gels parfaitement limpides contenant plus de 100 grammes de lipides par litre. L'éther est absolument incapable d'arracher à sa solution la moindre partie des phospholipides et, pour séparer complètement les lipi-

⁽¹⁾ J. FEINSCHMIDT. Die Säureflockung von Lecithinen und Lecithineisweizmischungen. *Biochem. Zeitschrift* (1912), 38, p. 244 à 251.

des des protéides, il faut dénaturer l'albumine par ébullition prolongée avec de l'alcool concentré, puis épuiser à l'éther. Les lipides ainsi obtenus ne donnent plus d'émulsion stable avec l'eau, et l'addition d'albumine à leur suspension aqueuse ne produit pas non plus la formation d'émulsion stable.

Principe du fractionnement.

Obtention de la solution mère des albumines.

Le sérum est recueilli aussi frais que possible sans hémolyse et parfaitement débarrassé des hématies.

Les globulines sont précipitées par addition d'un volume égal d'une solution saturée et parfaitement neutre de sulfate d'ammonium purifié, puis séparées par centrifugation. La solution albumineuse obtenue doit être parfaitement limpide ; aussi est-il nécessaire de filtrer les portions ayant entraîné quelques grains de précipité.

Lors de leur précipitation, les globulines entraînent toujours une quantité notable d'albumine qu'il est facile de récupérer en redissolvant les globulines dans le plus petit volume d'eau possible, puis en les précipitant à nouveau par un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium égal au volume de l'eau employée pour la redissolution. Les globulines précipitées sont séparées par centrifugation d'une eau mère contenant la majeure partie des albumines entraînées au cours de la première précipitation. La solution albumineuse ainsi obtenue est réunie à la première ; l'ensemble constitue la solution mère des albumines utilisée pour le fractionnement.

Précipitation de l'ensemble des albumines.

Cette opération a pour but de rassembler les albumines en une solution plus concentrée et de les débarrasser de la plus grande partie du sulfate d'ammonium et des composés solubles provenant du sérum (sels, sucre, urée, etc.). Le principe est le suivant : En présence d'une quantité suffisante de sulfate d'ammonium, une variation appropriée de la concentration des ions hydrogène diminue suffisamment la solubilité des albumines pour provoquer leur précipitation presque quantitative.

Plus la concentration en sulfate d'ammonium est forte, plus la précipitation des albumines est complète, il faut donc ajouter à la solution mère des albumines du sulfate d'ammonium (en

solution saturée) jusqu'à début de précipitation, puis ajouter progressivement de l'acide sulfurique normal au cinquième jusqu'à ce que la précipitation soit à son maximum.

Le terme de la précipitation est impossible à saisir directement en présence d'un abondant précipité se déposant très lentement; il est cependant nécessaire de ne pas ajouter un excès d'acide qui tendrait à redissoudre une partie du précipité et favoriserait la dénaturation des albumines. Une expérience préalable est nécessaire, il faut étudier les variations de la concentration en ions hydrogène en fonction des quantités d'acide titré ajoutées à une portion aliquote (20 cm^3) de la solution et noter, après chaque addition, si la précipitation augmente. On se rend ainsi compte, à peu près, de la quantité d'acide nécessaire, puis sur une autre portion de la solution albumineuse placée dans un tube de centrifugeuse, on ajoute assez d'acide pour être proche de l'optimum sans toutefois l'atteindre, et, avant d'ajouter une nouvelle goutte d'acide, on rassemble par centrifugation le précipité déjà formé. Après constatation de la formation d'un précipité, il faut, avant de centrifuger, agiter le tout pour rendre homogène la concentration des ions hydrogène dans le liquide et dans le précipité déjà rassemblé en culot. Lorsque, par additions successives d'acide, on est très proche de l'optimum, il faut après chaque addition nouvelle, et pour être certain qu'il n'apparaîtra pas de précipité, laisser la solution en repos pendant une demi-heure au moins, car la précipitation des dernières portions n'est pas instantanée.

Pour tous les sérums de cheval étudiés le terme de la précipitation s'est trouvé aux environs de pH 3,8, rarement 3,7. Ceci connu, il est donc possible, lors de l'étude d'un nouveau sérum, de déterminer simplement la quantité d'acide nécessaire pour amener le pH à 3,75 en traçant la courbe des variations du pH en fonction du volume d'acide ajouté.

L'appareil employé est figuré ci-contre (fig. 1) :

Un flacon à large ouverture de 150 cm^3 de capacité est fermé par un bouchon de liège paraffiné percé de quatre trous livrant passage à : 1° un siphon S rempli d'une solution saturée de chlorure de potassium gélifiée par de l'agar ;

2° un tube effilé T plongeant seulement de quelques millimètres dans le flacon et destiné à l'échappement de l'hydrogène ;

3° un tube adducteur d'hydrogène A ayant à l'intérieur un tube concentrique beaucoup plus étroit supportant l'électrode de platine platiné E et contenant du mercure faisant la liaison électrique entre l'électrode et le fil conducteur F ;

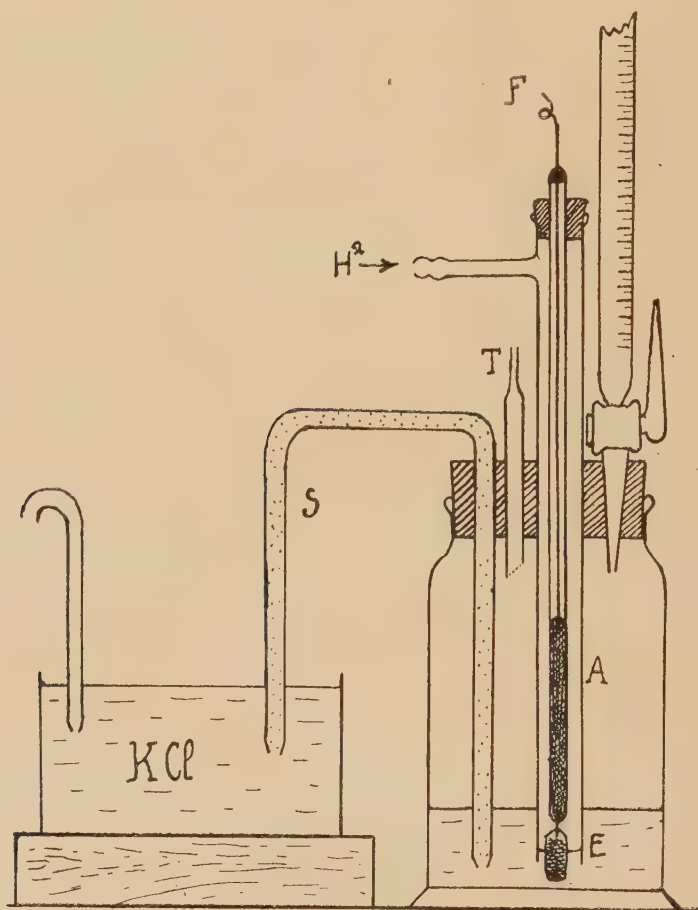


Fig. 1.

4° un embout de microburette entrant à frottement dur et dépassant de plusieurs millimètres la face inférieure du bouchon. La partie supérieure de cette burette, non figurée sur le schéma, est fixée par une simple suspension élastique permettant l'agitation de l'ensemble. Dans la burette est de l'acide sul-

furique normal au cinquième ; dans le flacon sont 20 cm³, exactement mesurés, de la solution étudiée.

L'hydrogène doit passer assez lentement car il se produit de la mousse qui ne doit pas sortir de l'appareil, il faut régler l'arrivée du gaz pour que la mousse n'atteigne jamais l'extrémité inférieure du tube T. L'expérience est assez longue, il faut après chaque addition d'acide attendre assez longtemps pour obtenir une constance parfaite de la force électromotrice.

Voici comme exemple les résultats obtenus avec une solution albumineuse provenant d'un sérum de cheval sain.

A chaque litre de la solution mère des albumines furent préalablement ajoutés 39 cm³ 5 de solution saturée de sulfate d'ammonium pour provoquer l'apparition d'un louche léger persistant à l'agitation, et l'étude des variations du pH fut faite sur une prise d'essai de 20 cm³ de la solution ainsi obtenue.

L'électrode au calomel contenait une solution saturée de chlorure de potassium.

La température était 18° C.

SO ⁴ H ² N/5 versé	Force électromotrice en millivolts	pH	Observations
0 cm ³	664,2	7,17	léger louche (1)
0,55 »	643,0	6,81	louche disparu, limpide
1,49 »	580	5,71	limpide
1,68 »	567	5,48	limpide
1,94 »	550	5,19	très légère opalescence
2,14 »	535	4,94	léger louche
2,35 »	520	4,67	louche net
2,53 »	510	4,50	louche fort
2,72 »	503,5	4,39	opaque
2,92 »	493,5	4,22	précipité en flocons
3,25 »	482,7	4,03	le précipité augmente
3,35 »	480,5	4,00	augmentation douteuse
3,73 »	470,0	3,81	ne semble plus augmenter
3,96 »	462,4	3,66	ne semble plus augmenter

(1) Ce léger louché était dû au sulfate d'ammonium ajouté préalablement, jusqu'à obtention d'un louche léger persistant.

En portant en abscisses les volumes de solution titrée versés et en ordonnées les forces électromotrices correspondantes on

obtient la courbe ci-contre qui permet de connaître la quantité d'acide à utiliser pour ajuster la concentration des ions hydrogène à un point quelconque désiré.

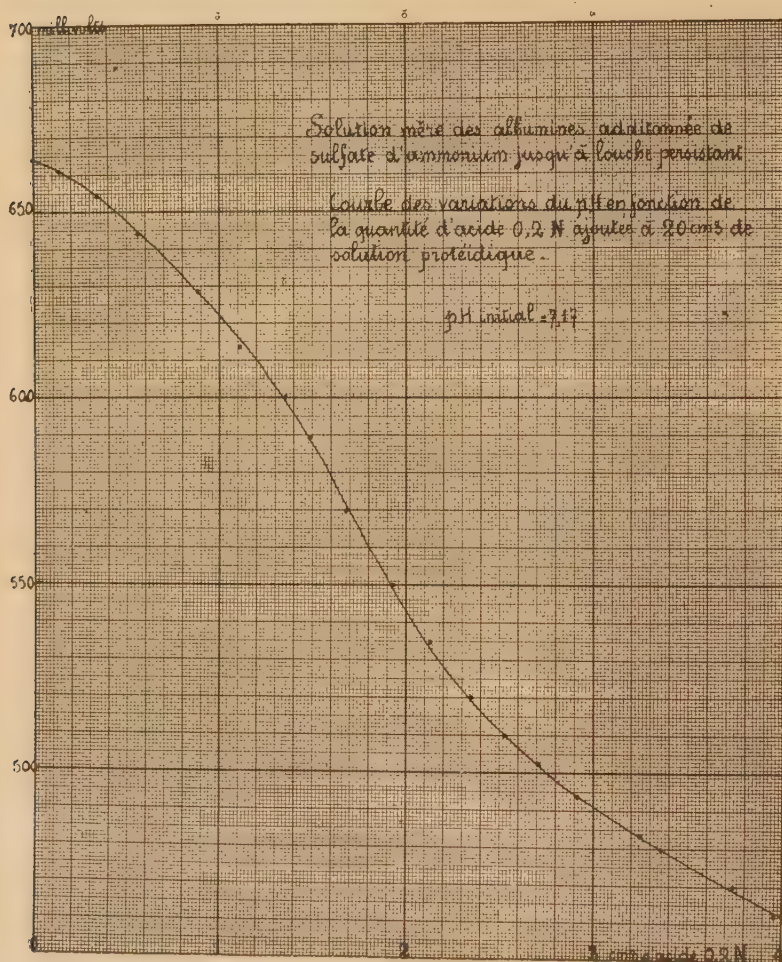


Fig. 2.

Pour fixer avec précision le pH ultime de précipitation, une nouvelle prise d'essai de 20 cm³ est introduite dans un tube de centrifugeuse avec la quantité d'acide normal au cinquième calculée d'après l'expérience précédente pour amener le pH à 4,00,

puis le précipité est centrifugé (le pH vérifié électrométriquement est de 4,05). Le liquide limpide est alors additionné de la quantité d'acide calculée pour faire baisser le pH jusqu'à 3,8, il se fait un nouveau précipité peu abondant qui met plusieurs heures pour se rassembler en flocons. Après centrifugation le liquide limpide est amené au pH 3,7 ce qui provoque seulement l'apparition d'un louche infime.

L'addition ultérieure d'acide ne précipite plus rien, même si le pH atteint 3,5; les eaux-mères contiennent cependant encore des protéides en petite quantité coagulables par la chaleur et décelables par le réactif de MILLON.

Connaissant le terme de la précipitation il est facile d'opérer sur l'ensemble de la solution albumineuse; on obtient ainsi un abondant précipité qui, recueilli par centrifugation, est propre à subir le fractionnement.

Fractionnement — La dissolution du précipité albumineux est impossible dans l'eau pure, mais assez facile et totale en présence d'ammoniaque en quantité suffisante pour redonner au mélange une concentration en ions d'hydrogène voisine de celle du sérum.

Le précipité est donc dissous dans un faible volume d'eau distillée grâce à l'addition de la quantité d'une solution normale d'ammoniaque strictement nécessaire pour amener le pH entre 7,3 et 7,6.

La solution ainsi obtenue est beaucoup moins riche en sulfate d'ammonium que la solution mère des albumines et, si l'on ramène le pH à 3,7, la précipitation sera loin d'être totale (d'autant plus forte cependant que la quantité d'eau utilisée pour la dissolution a été plus faible).

Le précipité ainsi obtenu, première fraction des albumines, précipitée par simple acidification, constitue la *fraction A*. Cette fraction sera dans la suite l'objet d'une étude particulière détaillée.

Les eaux-mères, décantées après centrifugation, sont toujours un peu opalescentes ou louches. Par acidification plus forte ($\text{pH} = 3$ ou même $\text{pH} = 2,7$) il n'apparaît plus aucun précipité dans ces eaux-mères, mais l'addition de sulfate d'ammonium provoque la formation d'un nouveau précipité d'importance variable avec la quantité de sel utilisée.

Le précipité obtenu par addition de un demi-volume de solution saturée de sulfate d'ammonium constitue la *fraction B*.

Les eaux-mères décantées après centrifugation sont limpides et contiennent encore des protéides qui, précipités par un excès de sulfate d'ammonium constituent la *fraction C*.

Fractionnement des trois fractions primitives.

Les fractions A, B et C, recueillies par centrifugation, sont dissoutes séparément dans un volume d'eau égal au dixième du volume du sérum dont elles dérivent, grâce à l'addition d'ammoniaque en quantité suffisante pour ajuster le pH final entre 7,3 et 7,6.

La solution de A est acidifiée jusqu'à pH 3,7, il se précipite une fraction dénommée A¹ dont l'eau-mère contient la fraction α^1 précipitable par un excès de sulfate d'ammonium.

A¹ est de nouveau mise en solution dans de l'eau grâce à de l'ammoniaque en quantité suffisante pour ajuster le pH entre 7,3 et 7,6 puis la solution est acidifiée à pH 3,7, il se précipite A² dont l'eau-mère contient la fraction α^2 .

Les solutions des fractions B et C ne laissent rien précipiter par acidification, elles sont donc fractionnées par additions successives de sulfate d'ammonium en B¹ et β^1 , C¹ et γ^1 .

On a finalement ainsi sept fractions :

$$A^2, \alpha^1, \alpha^2, B^1, \beta^1, C^1, \gamma^1,$$

parmi lesquelles :

A², α^1 , α^2 dérivent de A.

B¹, β^1 dérivent de B.

C¹, γ^1 dérivent de C.

Protocole d'une expérience de fractionnement.

1° *Séparation des globulines*. — A 1.000 cm³ de sérum ajouter, en agitant, 1.000 cm³ d'une solution neutre de sulfate d'ammonium saturée à 15°; agiter longuement puis laisser reposer, à la glacière, trois ou quatre heures; centrifuger et décanter la

solution albumineuse dont le volume est 1.625 cm^3 dans l'exemple choisi.

Les globulines sont remises en solution par 365 cm^3 d'eau distillée, puis précipitées à nouveau par 365 cm^3 de la solution saturée de sulfate d'ammonium. Après centrifugation décanter la solution dont le volume est 705 cm^3 . Cette solution est réunie à la solution albumineuse déjà obtenue; le volume total est donc 2.330 cm^3 .

2° *Précipitation de l'ensemble des albumines.* — a) Ajouter 95 cm^3 de solution saturée de sulfate d'ammonium, quantité suffisante, dans l'exemple choisi, pour provoquer l'apparition d'un louche léger persistant à l'agitation. Le volume total de la solution mère des albumines est donc 2.425 cm^3 .

b) Acidifier à pH 3,7 par la quantité d'acide sulfurique normal au cinquième, calculée à l'avance d'après la courbe tracée avec 20 cm^3 de la solution.

Sur cette courbe, dans le cas présent, l'abscisse correspondant à pH 3,7 est $3,76 \text{ cm}^3$ d'acide N/5. Après prélèvements pour courbe (20 cm^3) et pour analyse (5 cm^3) il reste 2.400 cm^3 de solution mère auxquels il faut donc ajouter 451 cm^3 d'acide normal au cinquième. Après agitation et repos de trois heures à la glacière, un abondant précipité un peu teinté de jaune est recueilli par centrifugation, c'est sur lui que va porter le fractionnement.

3° *Fractionnement proprement dit.* — Le précipité est dissous dans 100 cm^3 d'eau et 30 cm^3 d'ammoniaque normale (pH final 7,5).

Pour précipiter la fraction A il faut 75 cm^3 d'acide sulfurique 0,4 N (correspondant aux 30 cm^3 d'ammoniaque).

Ajouter l'acide progressivement, agiter continuellement, le précipité n'apparaît que tardivement, lorsque l'acide est presque entièrement versé, mais il apparaît assez brusquement et augmente très vite.

Laisser deux heures à la glacière, centrifuger, décanter. A un volume d'eau-mère ajouter un demi-volume de solution saturée de sulfate d'ammonium, la fraction B précipite. La précipitation commence seulement lorsque près des trois quarts du sulfate d'ammonium sont déjà ajoutés, elle apparaît assez brusquement et augmente très vite. A un volume d'eaux-mères décantées après repos à la glacière et centrifugation, ajouter

encore un demi-volume de solution saturée de sulfate d'ammonium (excès certain) la fraction C précipite.

Pour poursuivre le fractionnement, dissoudre chacune des fractions A, B, C dans 100 cm³ d'eau distillée en présence de la quantité d'ammoniaque normale nécessaire pour ajuster le pH entre 7,3 et 7,6.

Tandis que les fractions B et C se dissolvent très facilement et très rapidement, la dissolution de A se termine lentement, il se forme des grumeaux qui se gonflent et leur périphérie devient un gel transparent, ils se soudent entre eux puis forment une masse gélatineuse transparente ; si l'on brise cette masse avec un agitateur, les morceaux se soudent à nouveau après quelques minutes de repos en un gliode transparent identique au précédent. Petit à petit, cependant, le volume du gliode diminue et, après quelques heures, la dissolution est intégrale ; la solution, parfaitement transparente est légèrement fluorescente, brun clair par transparence, verte par réflexion.

Pour dissoudre A, il a fallu ici 12 cm³ de solution normale d'ammoniaque.

Sur le sérum étudié ici, le fractionnement a seulement été poussé jusqu'à l'obtention des 7 fractions A², α^1 , α^2 , B¹, β^1 , C¹, γ^1 . Voici les résultats obtenus en dosant le phosphore (1) dans les coagulums trichloracétiques d'échantillons provenant de ces diverses fractions.

Fractions	Prise d'essai, coagulum sec	Phosphore trouvé	Phosphore pour 100 de coagulum sec
A ²	143 mg.	0,566 mg.	0,395
α^2	157 »	0,247 »	0,157
α^1	137 »	0,128 »	0,093
B ¹	439 »	0,191 »	0,043
β^1	201 »	0,121 »	0,060
C ¹	150 »	0,087 »	0,058
γ^1	138 »	0,131 »	0,095

(1) La méthode de dosage du phosphore utilisée ici est celle proposée par l'auteur dans le *Bulletin de la société de chimie biologique*, t. VII, n° 5, pp. 464 à 469 (mai 1926) et dont le principe est exposé plus loin dans le présent mémoire (page 53).

Ces résultats ne sont pas rigoureusement constants mais varient légèrement avec les sérums étudiés. Voici les teneurs extrêmes en phosphore de ces diverses fractions dans les sept sérums de cheval où cette étude a été poussée jusqu'au bout.

Fractions	Phosphore pour 100 de coagulum sec	
	minimum	maximum
A ²	0,380	0,495
α^2	0,113	0,157
α^1	0,078	0,093
B ¹	0,029	0,045
β^1	0,050	0,060
C ¹	0,047	0,060
γ^1	0,030	0,098

Sauf pour la fraction γ^1 les variations sont toujours assez faibles et ne font pas changer l'ordre de grandeur.

Quatre des sangs étudiés provenaient de chevaux sains, abattus à la suite d'accidents et jugés par le service vétérinaire bons pour la boucherie.

Les trois autres sangs furent prélevés par ponction de la veine jugulaire sur des chevaux considérés comme sains par M. FRAZÉ, vétérinaire de l'Institut Pasteur.

Les fractions B et C et leurs dérivées B¹, β^1 , C¹, γ^1 sont pauvres en phosphore, leur étude ne sera donc pas poussée plus avant dans le cours de ce travail.

La fraction A (comme ses dérivées A¹ et A²) est au contraire riche en phosphore, sur elle portera la suite de cette étude.

Cette fraction A a été obtenue, on l'a vu, par acidification à pH 3,7 de la solution mère des albumines riche en sulfate d'ammonium.

De la solution neutre de A a été précipitée A¹ par acidification à pH 3,7.

De la solution neutre de A¹ a été précipitée A² par acidification à pH 3,7.

A² est plus riche en phosphore que A¹ qui est elle-même plus riche que A ; le phosphore se rassemble donc dans la partie précipitable par acidification.

Les dissolutions et précipitations successives continuées ainsi permettent d'obtenir une série de précipités dérivant les uns des autres dénommés A^1 , A^2 , A^3 , ..., A^n et une série d'eaux-mères correspondantes désignées par α^1 , α^2 , α^3 , ..., α^n (Les indices numériques indiquent le nombre de précipitations effectuées à partir de A).

La fraction A^2 se différencie déjà très nettement des fractions B^1 , β^1 , C^1 , γ^1 , α^1 et α^2 et mérite une étude particulière détaillée.

Etude particulière de la fraction A².

Propriétés physiques. — Obtenue par précipitation à pH 3,7 elle se présente sous la forme d'un précipité floconneux amorphe blanc jaunâtre très légèrement teinté de vert.

Solubilité presque nulle dans l'eau pure, mais très grande en présence de la quantité d'ammoniaque nécessaire pour amener le pH au-dessus de 7,3. Dans ces conditions la dissolution est assez rapide au début, mais il se forme des grumeaux qui se dissolvent très lentement ; ils gonflent, deviennent transparents, se soudent en une masse gluante qui se dissout lentement par gonflement progressif. Si l'on brise ce gliode avec un agitateur, les fragments se soudent à nouveau, après quelques instants de repos, en une masse homogène.

Ce phénomène est caractéristique des fractions A¹ et ne se rencontre pas avec les autres fractions qui se dissolvent très rapidement dans l'eau pure ou tout au moins dans de l'eau légèrement ammoniacale.

La solution de A² est un peu plus colorée que celle des autres fractions, elle est brune avec fluorescence verte mais parfaitement limpide, elle ne subit aucune modification sensible par centrifugation ni par filtration sur papier ou sur bougie de porcelaine. La solution ainsi filtrée est parfaitement limpide et présente, au microscope, le même aspect qu'une solution très pure d'albumine.

Propriétés chimiques. — Beaucoup plus riche en phosphore que les autres fractions.

L'acide trichloracétique, l'iode en solution iodurée et la plupart des réactifs précipitant les protéïdes précipitent A² et le précipité contient tout le phosphore. L'alcool cependant fait exception : à froid, le phénomène est variable avec les concentrations en ions hydrogène et avec les quantités respectives d'alcool et de A², mais le phosphore n'est jamais entièrement précipité ; à chaud, le phosphore reste presque quantitativement dans la

solution alcoolique et le coagulum est très pauvre en phosphore.

Etude de la précipitation de A^2 par l'alcool.

En ajoutant progressivement de l'alcool froid dans une solution, légèrement alcaline et assez diluée de A^2 , on constate les phénomènes suivants :

Les premières portions d'alcool font apparaître un abondant précipité amorphe blanc teinté de jaune pâle, puis l'addition d'alcool en excès provoque la dissolution de ce précipité, plus ou moins complète, d'ailleurs, suivant la concentration initiale en A^2 et la réaction du milieu.

1° *En milieu alcalin* ($pH > 8$). — Si la solution de A^2 est assez diluée, la solution alcoolique obtenue est presque limpide, un peu opalescente. Si la solution de A^2 est plus concentrée le précipité primitivement formé ne se dissout que partiellement dans l'excès d'alcool.

2° *En milieu peu alcalin* ($7,3 < pH < 8$). — Pour que tout le précipité se dissolve dans un excès d'alcool il faut que la solution de A^2 soit très diluée.

3° *En milieu neutre ou acide*. — Il est impossible d'obtenir la dissolution totale dans un excès d'alcool.

En outre de ces phénomènes extemporanés, se manifestent plus tardivement d'autres faits intéressants :

1° Dans toutes les solutions alcooliques surmontant les précipités se trouvent en abondance des protéides qui précipitent progressivement dans les jours suivants ; après une semaine, à la température ordinaire, leur précipitation n'est pas toujours complète. Les précipités tardifs ainsi formés sont insolubles dans un excès d'alcool, insolubles également dans l'eau neutre, acide ou alcaline ; ce sont des coagulum de protéides dénaturés.

2° Dans tous les cas où la concentration en A^2 est suffisante, il apparaît également, à la longue, un précipité cristallin constitué par des aiguilles fines et soyeuses d'esters de cholestérol ; très rapidement d'ailleurs, dans certains cas, le début de cette précipitation s'annonce par l'apparition d'un louche formant des moires par agitation.

3° Après un contact suffisamment prolongé de l'alcool et de A^2 tous les protéides sont enfin précipités et dénaturés ; la cristallisation des stériles se termine et les liquides surnageant deviennent limpides.

Voici le protocole détaillé de ces expériences.

1° *Influence de la concentration de la solution en A^2 sur la précipitation par l'alcool.* — La solution de A^2 utilisée est à pH 8,5 et donne 0 gr. 070 de précipité trichloracétique sec par cm^3 .

Une série de dilutions est faite dans six tubes à essais.

N° des tubes	VOLUME de solution de A^2	VOLUMES d'eau	VOLUME total
1	1 cm^3	4 cm^3	5 cm^3
2	1,5 »	3,5 »	5 »
3	2 »	3 »	5 »
4	3 »	2 »	5 »
5	4 »	1 »	5 »
6	5 »	0 »	5 »

Dans chacun des tubes sont ensuite versés 50 cm^3 d'alcool à 96° C. ; après agitation le titre alcoolique final est donc partout voisin de 86,5 C.

Il n'apparaît pas de précipité dans les tubes 1, 2 et 3 et si parfois il s'en forme un pendant que l'alcool est versé il disparaît par agitation. Voici d'ailleurs un tableau indiquant pour chacun des tubes les phénomènes constatés dès l'addition de l'alcool ou dans les heures et jours qui suivirent (L'ensemble étant maintenu dans une glacière à + 5° C.) (voir page suivante).

De cette expérience se dégagent quelques faits :

1° Dans les tubes où la quantité de A^2 n'est pas trop grande, il n'apparaît pas de précipité par addition d'alcool, et, la solution ainsi obtenue est assez stable puisqu'elle peut être gardée plusieurs jours à la glacière sans changer d'aspect. Les quantités de A^2 présentes ne sont cependant pas négligeables : dans le tube n° 3, par exemple, il y a 0 gr. 14 de substance sèche (précipitable par l'acide trichloracétique) pour 5 cm^3 de solution aqueuse, soit 28 grammes par litre. Si l'on rapporte au volume total après addition de l'alcool, on trouve 2 gr. 54 par litre en solution dans de l'alcool à 86,5 C

2° Dans tous les tubes, plus ou moins tardivement d'ailleurs,

Tubes N ^{os}	Aspect des le mélange	Une heure après	Trois heures après	Un jour après	Une semaine après
1	pas de précipité très légère opalescence	pas de précipité très légère opalescence	pas de précipité très légère opalescence quelques légères moires apparaissent par agitation	précipité floconneux ras- semblé au fond liquide surnageant lim- pide	précipité floconneux ras- semblé au fond. Li- quide surnageant lim- pide
2	pas de précipité légère opalescence	pas de précipité légère opalescence	pas de précipité opalescent. Quelques moi- res à l'agitation	pas de précipité opalescent. Quelques moi- res à l'agitation	pas de précipité opalescent. Moires par agitation
3	pas de précipité forte opalescence, moires par agitation	pas de précipité forte opalescence, moires par agitation	pas de précipité moires très abondantes	pas de précipité moires très abondantes	précipité rassemblé au fond du tube. Liquide surnageant limpide
4	précipité abondant se ras- semblant mal pas de moires	le précipité est toujours en suspension	le précipité est toujours en suspension	petite quantité de préci- pité amorphe rassemblé au fond. Quelques fines aiguilles cristallines forment un feutrage à sa surface	précipité abondant ras- semblé au fond. Liqui- de surnageant limpide
5	précipité très abondant se rassemblant vite au fond du tube	précipité rassemblé liquide surnageant trou- ble dans lequel appa- raissent des moires par agitation	aspect inchangé, les moi- res sont peut-être un peu plus abondantes	de fines aiguilles enche- vêtrées forment un épais feutrage au-des- sus du premier précipi- té. Liquide encore lou- che. Plus de moires	les précipités se sont ac- crus. Liquide surna- geant limpide
6	précipité très abondant se rassemblant vite	précipité rassemblé au fond deux fois plus abondant que dans le tube n ^o 5 liquide très trouble	le liquide surnageant est un peu moins trouble et l'agitation y fait ap- paraître des moires	très belles aiguilles au- dessus du précipité amorphe. Liquide sur- nageant encore trouble	les précipités se sont ac- crus. Liquide surna- geant limpide

l'agitation fait apparaître des moires. Ceci est l'indice d'une cristallisation, de très fines aiguilles restant en suspension par suite de leur petitesse. Dans les tubes où les solutions sont assez concentrées on voit grossir peu à peu ces aiguilles qui finissent par devenir visibles à l'œil nu et par se rassembler en un feutrage abondant à la surface du précipité protéidique amorphe déjà rassemblé au fond du tube.

3° Dans les tubes 5 et 6 il apparaît dès le début un précipité amorphe, mais le rapport des volumes de ces précipités n'est pas égal au rapport des quantités de A^2 présentes dans ces tubes.

Dans le tube 5 il y a 4 cm³ de solution de A^2 .

Dans le tube 6 il y a 5 cm³ de solution de A^2 . Or le volume du précipité du tube 6 est à peu près égal au double de celui du tube 5.

Si cependant on compare à nouveau les volumes des précipités de ces deux tubes après huit jours, lorsque les précipitations sont terminées, on constate que leurs volumes sont bien proportionnels aux quantités de A^2 , leur rapport est 5/4. Ce fait est général et, lorsque les précipitations sont terminées dans les six tubes, les précipités rassemblés au fond des tubes occupent tous des volumes proportionnels aux quantités de A^2 dont ils dérivent, les protéides sont complètement coagulés.

Cet ensemble de faits suggère quelques questions :

1° Les phénomènes sont-ils très différents pour les autres fractions ?

2° Quels facteurs physiques influent sur cette précipitation ? température, concentration en ions hydrogène, concentration en alcool ?

3° De quelles natures sont les précipités obtenus ?

Pour répondre à la première question il faut opérer sur toutes les autres fractions dans des conditions identiques : même pH, même titre final en alcool, même température, même concentration en substances précipitables par l'acide trichloracétique, même teneur en sulfate d'ammonium.

Dans de telles conditions, toutes les autres fractions à toutes les dilutions, sont instantanément floculées par l'alcool à 86,5 C. Pour les fractions α^1 , B^1 , β^1 , C^1 , γ^1 , les liquides surnageant les précipités sont très rapidement limpides et l'agitation n'y fait

jamais naître des moires. Pour la fraction α^2 , la floculation est aussi instantanée, quelle que soit la concentration, mais le liquide surnageant est assez longtemps louche et présente, dans les tubes les plus concentrés en α^2 , des moires très légères par agitation, sans jamais cependant que les aiguilles grossissent assez pour être visibles à l'œil ou même à la loupe. Or cette fraction α^2 est la plus proche de A^2 et ces quelques moires peuvent s'expliquer par entraînement d'un peu de A^2 ou de l'un de ses constituants.

Influence de la température sur la précipitation par l'alcool.

Parallèlement à la série des six tubes préparés pour l'expérience précédente, à la glacière à $+ 5^\circ$, on prépare deux autres séries identiques, mais avec des réactifs portés préalablement à des températures plus élevées, à 15° C. pour la deuxième série et à 33° C. pour la troisième; ces séries de tubes sont ensuite placées dans des thermostats maintenus, l'un à 15° , l'autre à 33° .

On constate que les aspects des trois séries dans les instants qui suivent l'addition de l'alcool sont identiques et que les aspects finaux après précipitation complète sont aussi identiques; seule la vitesse d'évolution des phénomènes est modifiée par les variations de température: tandis qu'à $+ 5^\circ$ C. le tube n° 2 (contenant 1 cm^3 5 de A^2) précipite seulement après neuf ou dix jours, à 15° C. la précipitation est complète après cinq jours environ et à 33° C. après vingt-quatre ou trente-six heures.

Même à la température d'ébullition de l'alcool, la coagulation des protéides n'est pas instantanément totale. En trempant, en effet, un tube tel que les n°s 2 ou 3 dans un bain-marie d'eau bouillante, puis en laissant bouillir l'alcool pendant une minute, on obtient, par centrifugation, un liquide légèrement opalescent qui contient encore des protéides.

Pour obtenir une coagulation complète il faut prolonger l'ébullition plus de dix minutes.

Influence de la réaction du milieu sur la précipitation de A^2
par l'alcool.

Pour cette étude, la solution de A^2 utilisée est la même que celle employée dans les expériences précédentes (Le pH de cette solution est 8,5).

Chaque centimètre cube contient 0 gr. 070 de substances précipitables par l'acide trichloracétique ; le précipité trichloracétique contient pour cent 0,395 de phosphore.

Pour obtenir trois solutions de mêmes concentrations en A^2 , mais de concentrations en ions H^+ différentes, trois prises d'essai identiques, de 30 cm³, sont traitées parallèlement. L'une est additionnée de 1 cm³ d'acide sulfurique normal ce qui amène le pH à 7,4, la deuxième est additionnée simplement de 1 cm³ d'eau neutre, le pH reste 8,5 ; à la troisième est ajouté 1 cm³ d'une solution deux fois normale d'ammoniaque ce qui amène le pH à 9,2.

Dans les trois solutions les concentrations en A^2 sont identiques : 0 gr. 0677 de précipité trichloracétique par centimètre cube.

Avec chacune des solutions ainsi obtenues on prépare une série de six tubes pour l'étude de la précipitation par l'alcool.

1 ^{er} tube :	4 cm ³	de solution	+ 4 cm ³	d'eau	+ 50 cm ³	d'alcool.
2 ^e tube :	4 cm ³ 5	de solution	+ 3 cm ³ 5	d'eau	+ 50 cm ³	d'alcool.
3 ^e tube :	2 cm ³	de solution	+ 3 cm ³	d'eau	+ 50 cm ³	d'alcool.
4 ^e tube :	3 cm ³	de solution	+ 2 cm ³	d'eau	+ 50 cm ³	d'alcool.
5 ^e tube :	4 cm ³	de solution	+ 1 cm ³	d'eau	+ 50 cm ³	d'alcool.
6 ^e tube :	5 cm ³	de solution	+ 0 cm ³	d'eau	+ 50 cm ³	d'alcool.

Dans chacun des tubes le titre alcoolique final est voisin de 86,5 C.

L'ensemble est maintenu à + 10° C. dans une chambre frigorifique pas trop froide pour que les phénomènes évoluent un peu moins lentement qu'à + 5° C. et soient observables en six jours.

Le tableau suivant montre les résultats obtenus :

	Tubes N ^{os}	pH = 7,4	pH = 8,5	pH = 9,2
Aspect dès l'addition de l'alcool	1	fortement opalescent	très légère opalescence	limpide
	2	très louche	légère opalescence	très faible opalescence
	3	précipité fin	forte opalescence, moires	opalescence
	4	précipité	précipité fin	louche
	5	précipité abondant	précipité	louche
	6	précipité très abondant	précipité abondant	précipité fin
Une heure après l'addition de l'alcool	1	louche	très légère opalescence	limpide
	2	précipité fin en suspension	légère opalescence	très faible opalescence
	3	précipité très fin en suspension	forte opalescence, moires	opalescence, quelques moires
	4	précipité décanté, liquide louche	le préc. est toujours en suspension	louche
	5	précipité décanté, liquide louche	précipité décanté, moires	précipité en suspension très fin
	6	précipité décanté, liquide louche	précipité décanté	précipité décanté peu abondant
Quinze heures après l'addition de l'alcool	1	précipité décanté, liquide limpide	<i>pas de précipité</i> , faibles moires	<i>pas de précipité</i> , presque limpide
	2	préc. déc., liquide presque limpide	<i>pas de précipité</i> , moires	<i>pas de précipité</i> , faibles moires
	3	louche, précipité décanté, très faible	<i>pas de précipité</i> , moires abondantes	<i>pas de précipité</i> , fortes moires
	4	louche, précipité décanté, 1,9 cm ³	le préc. est toujours en suspension	<i>louche</i> , pas de moires
	5	louche, précipité décanté, 3,7 cm ³	précipité décanté, feutrage d'aiguilles	précipité 1,5 cm ³ , peu d'aiguilles
	6	louche, précipité décanté, 5,5 cm ³	précipité décanté, feutrage d'aiguilles	précipité 3,0 cm ³ , aiguilles
Un jour après l'addition de l'alcool	1	précipité décanté, liquide limpide	précipité floconneux	<i>pas de précipité</i> , presque limpide
	2	précipité décanté, liquide limpide	<i>pas de précipité</i> , moires	<i>pas de précipité</i> , moires
	3	louche, précipité décanté abondant	<i>pas de précipité</i> , moires abondantes	<i>pas de précipité</i> , fortes moires
	4	préc. décanté, aiguilles abondantes	précipité décanté, quelques aiguilles	<i>louche</i> , pas de moires
	5	précipité décanté, aiguilles moins abondantes	préc. décanté, aiguilles abondantes	les aiguilles se sont accrues
	6	précipité décanté, quelques aiguilles	préc. décanté, aiguilles abondantes	précipité, aiguilles abondantes
Deux jours après l'addition de l'alcool	1	précipité décanté, liquide limpide	précipité décanté, liquide limpide	<i>pas de précipité</i> , presque limpide
	2	précipité décanté, liquide limpide	<i>pas de précipité</i> , moires	<i>pas de précipité</i> , moires
	3	précipité, liquide presque limpide	<i>pas de précipité</i> , moires abondantes	<i>pas de précipité</i> , très fortes moires
	4	précipité décanté, liquide limpide	précipité décanté, quelques aiguilles	<i>louche</i>
	5	précipité décanté, liquide limpide	préc. décanté, aiguilles abondantes	précipité, aiguilles très abondantes
	6	précipité décanté, liquide limpide	préc. décanté, aiguilles abondantes	précipité, aiguilles très abondantes

De cet ensemble de faits on peut conclure à une action prépondérante de la concentration des ions hydrogène sur la précipitation par l'alcool. En milieu très peu alcalin (pH 7,4) et quelle que soit la concentration en A^2 il apparaît instantanément un précipité amorphe. Si le milieu est plus alcalin (pH 8,5) il n'apparaît pas de précipité amorphe dans les tubes peu concentrés en A^2 , mais seulement un louche dû à de très fines aiguilles en suspension. Si le milieu est encore plus alcalin (pH 9,2) les tubes où la concentration en A^2 est faible restent plusieurs jours limpides et c'est seulement dans les tubes où la concentration est très forte qu'apparaissent de très petites quantités de précipité amorphe lors de l'addition de l'alcool.

Après deux jours à pH 7,4 tout est précipité, les précipités sont rassemblés au fond des tubes et les liquides surnageants sont limpides. A pH 9,2, au contraire, après deux jours, aucun précipité ne s'est déposé, dans les quatre premiers tubes et seules de très fines aiguilles en suspension troublent le liquide.

Un autre fait important est à noter : les volumes des précipités amorphes apparaissant lors de l'addition de l'alcool et se décantant rapidement ne sont pas proportionnels aux quantités de A^2 présentes. Mais la différence des volumes des précipités de deux tubes consécutifs est à peu près constante pour un même pH.

Le tableau ci-dessous indique les rapports entre les volumes apparents des précipités apparus dès l'addition de l'alcool et les quantités de A^2 dont ils dérivent.

Le titre final de l'alcool est dans tous les cas voisin de 86,5 C.

Nos des tubes	Volumes de solution de A^2 contenus dans chacun des tubes	Volumes apparents des précipités sédimentés après 6 heures à + 5°	
		pH = 7,4	pH = 9,0
1	1 cm ³	0 cm ³	0 cm ³
2	1,5 »	0 »	0 »
3	2 »	0,2 »	0 »
4	3 »	2,0 »	trace
5	4 »	3,7 »	1,5 »
6	5 »	5,5 »	3,0 »

Entre deux tubes consécutifs, à pH 7,4, la différence des volu-

mes apparents est toujours très voisine de $1\text{ cm}^3\text{ 8}$; à pH 9,0, cette différence, constante également, est un peu plus faible ($1\text{ cm}^3\text{ 5}$).

Tout semble donc se passer comme si, au-dessous d'une certaine concentration en A^2 (variable avec le pH), tout se dissolvait et si, au-dessus de cette concentration limite, tout l'excès restait précipité et ne se dissolvait plus dans l'excès d'alcool. Chaque centimètre cube de A^2 ajouté en sus de la concentration limite provoque la formation d'un précipité occupant $1\text{ cm}^3\text{ 8}$ à pH 7,4 et $1\text{ cm}^3\text{ 5}$ à pH 9,0.

Si l'on compare les mêmes tubes après 10 jours de repos à la température ordinaire, lorsque tous les protéides sont dénaturés et coagulés dans tous les tubes, on constate que les volumes apparents des précipités sédimentés sont proportionnels aux quantités de A^2 dont ils dérivent.

Cette expérience fait prévoir une différence de nature entre les précipités apparus dès l'addition de l'alcool dans les tubes concentrés en A^2 et les précipités protéïdiques tardifs qui se forment dans les jours suivants dans tous les tubes, même dans ceux où la quantité de A^2 est très faible.

En résumé. — 1° En solution suffisamment alcaline ou suffisamment diluée, A^2 n'est pas précipité par 10 volumes d'alcool à 96° C . Les solutions alcooliques ainsi obtenues ne sont pas stables et laissent, dans les jours suivants, déposer d'une part des précipités amorphes et d'autre part des aiguilles cristallines. La terminaison de ces précipitations est d'autant plus lente que la température est plus basse.

2° Dans les solutions de A^2 moins alcalines ou trop concentrées, l'addition de 10 volumes d'alcool provoque l'apparition instantanée d'un précipité amorphe; le liquide surnageant ce premier précipité laisse déposer, dans les jours suivants, des aiguilles cristallines et un nouveau précipité amorphe.

3° Dans tous les cas il faut plusieurs jours pour que se terminent les précipitations et que l'alcool surnageant devienne parfaitement limpide.

**Étude chimique des divers précipités obtenus par action
de l'alcool.**

1° PRÉCIPITÉS AMORPHES. — Il faut distinguer les précipités amorphes apparaissant dès l'addition de l'alcool dans les tubes où la quantité de A^2 est suffisamment grande des précipités amorphes apparaissant tardivement dans les jours qui suivent ; leurs constitutions et leurs propriétés sont très différentes.

Les précipités apparaissant tardivement sont constitués par des protéïdes très purs mais dénaturés, insolubles dans l'eau ; ils sont très pauvres en phosphore, moins de 0,01 0/0.

Si l'on prend la précaution de centrifuger la solution alcoolique pour enlever les aiguilles formées avant l'apparition de ces précipités tardifs, on obtient ensuite des coagulums protéïdiques très purs, sans acides gras, sans lécithine, sans phosphore (moins de 0,003 0/0) et pauvres en cholestérol. Les précipités apparaissant dès l'addition de l'alcool dans les tubes riches en A^2 contiennent, au contraire, une proportion variable, mais assez notable, de phosphore ; ces précipités sont en partie solubles dans l'eau si on ne les laisse pas trop longtemps en contact avec l'alcool, et la partie soluble dans l'eau est beaucoup plus riche en phosphore que la partie insoluble.

Voici par exemple les résultats trouvés pour un sérum de cheval :

Le précipité trichloracétique de la solution de A^2 contenait 0,38 0/0 de phosphore. Le pH était 8,00, la solution était assez concentrée en A^2 et le poids du précipité trichloracétique sec obtenu avec 1 cm³ de la solution était 0 gr. 086. Un volume de cette solution fut additionné de dix volumes d'alcool à 96°, puis le précipité, séparé le plus rapidement possible par centrifugation et décantation, fut repris par un excès d'eau neutre et la partie insoluble séparée par centrifugation.

Plus de la moitié du précipité alcoolique était soluble dans l'eau, la solution incolore était presque parfaitement limpide et précipitait encore par acidification comme les solutions de A^2 .

Les teneurs en phosphore étaient très différentes :

Dans la partie soluble : 0,233 0/0 de phosphore.

Dans la partie insoluble : 0,006 0/0 de phosphore.

Seule la partie soluble dans l'eau contient donc du phosphore. Dans la partie insoluble la teneur en phosphore est de l'ordre des teneurs rencontrées dans les précipités tardifs ou dans les précipités obtenus par action de l'alcool chaud.

2° PRÉCIPITÉS CRISTALLINS. — Représentés uniquement par de longues et belles aiguilles très fines se terminant en pointes acérées. Ces aiguilles sont enchevêtrées mais très rarement soudées

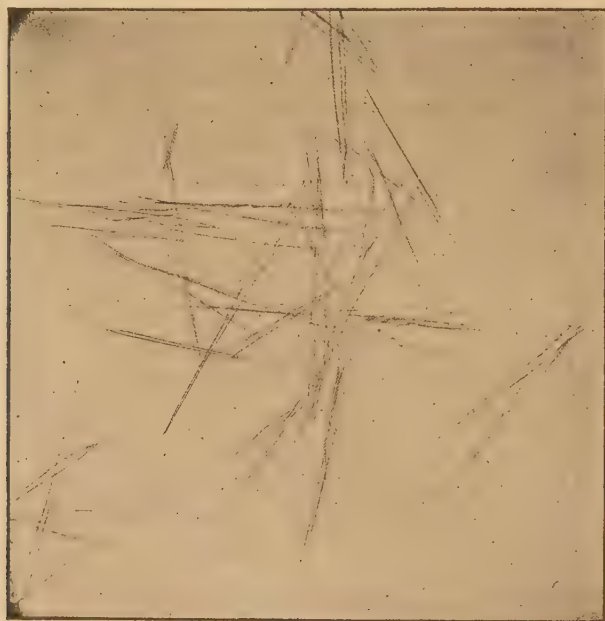


Fig. 3.

en macles. Suivant la rapidité de leur formation ces aiguilles sont plus ou moins développées, atteignant parfois plusieurs millimètres de long, mais elles semblent toutes identiques. Ces cristaux sont incolores, très réfringents, insolubles dans l'eau et très peu solubles dans l'alcool froid, bien plus solubles dans l'alcool bouillant, très solubles dans l'éther et le chloroforme.

Pour les purifier, il est facile d'utiliser la grande différence de solubilité dans l'alcool chaud et dans l'alcool froid, en les dissolvant dans le moins possible d'alcool absolu bouillant puis laissant cristalliser par refroidissement lent suivi d'un séjour pro-

longé à la glacière. Le rendement de cette purification est assez mauvais, il reste des quantités assez notables de substance dans l'alcool même après deux jours à la glacière.

Après deux cristallisations dans l'alcool absolu les cristaux fondent à 41° C. sur bain de mercure.

L'analyse qualitative révèle la présence de carbone et d'hydrogène, l'absence de phosphore, de soufre et d'azote.

L'analyse élémentaire par les méthodes microanalytiques de Pregl donne :

$$\text{C } 0/0 = 82,2.$$

$$\text{H } 0/0 = 12,1.$$

La solution chloroformique des cristaux donne très intensément la réaction de LIEBERMANN ⁽¹⁾ mais la teinte finale obtenue est inférieure à celle obtenue avec une solution de cholestérol pur ayant même concentration. Le rapport des intensités des colorations, apprécié au colorimètre est 0,60 environ.

Au cours de cette expérience, on constate que lors de l'addition de l'acide sulfurique à la solution de la substance dans le chloroforme et l'anhydride acétique, la teinte se développe beaucoup plus rapidement que pour la solution témoin de cholestérol pur ; la teinte maxima est atteinte plus rapidement, mais elle est un peu plus jaune que pour le cholestérol pur, et la comparaison quantitative des teintes est donc assez difficile et peu précise.

Ces phénomènes rappellent ceux constatés en effectuant la réaction de LIEBERMANN sur des esters de cholestérol, les cristaux étudiés ici sont bien en effet constitués par un ester de cholestérol, puisque le digitonoside ne donne aucun précipité avec leur solution mais donne par contre un abondant précipité avec la solution de leurs produits de saponification.

Un certain poids de substance est donc saponifié à chaud par de la potasse alcoolique, puis l'insaponifiable est séparé quantitativement par de l'éther de pétrole ; le produit de cette extraction, purifié par reprise à la potasse alcoolique et à l'éther de pétrole pèse, sec, 63 0/0 du poids des cristaux mis en expérience.

(¹) Apparition d'une teinte verte par addition à la solution chloroformique d'un volume égal d'anhydride acétique et d'une très petite quantité d'acide sulfurique concentré.

Ce résidu est bien constitué par du cholestérol pur car il se combine quantitativement au digitonoside.

Voici d'ailleurs le protocole de l'une de ces expériences :

Poids des cristaux servant au dosage : 0 gr. 0212.

Poids de cholestérol pesé en nature : 0 gr. 0134.

Rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{cristaux}} = 0,63.$

Poids de complexe de Windaus : 0 gr. 0533.

Valeurs théoriques calculées du rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{ester de cholestérol}}$ pour différents esters de cholestérol :

Palmitate de cholestérol : 0,620.

Myristate de cholestérol : 0,647.

Oléate de cholestérol : 0,606.

Le point de fusion des cristaux étudiés ici est, nous l'avons vu, voisin de 41°, l'oléate de cholestérol fond entre 41° et 43° et se présente aussi sous la forme d'aiguilles fines, mais les acides gras obtenus par saponification des aiguilles qui nous occupent sont solides à la température de la salle de micro-analyse (22° C.) et l'analyse quantitative par les méthodes microanalytiques donne :

$$\text{C } 0/0 = 73,90 \quad \text{et} \quad \text{H } 0/0 = 12,26$$

Les valeurs théoriques sont :

Pour un acide saturé en C¹⁶ :

$$\text{C } 0/0 = 75,0$$

$$\text{H } 0/0 = 12,5$$

Pour un acide saturé en C¹⁴ :

$$\text{C } 0/0 = 73,7$$

$$\text{H } 0/0 = 12,3$$

Les chiffres trouvés correspondent assez bien à un acide en C¹⁴ sans cependant permettre une conclusion définitive.

Par suite des difficultés rencontrées en cherchant à se procurer des quantités importantes de ces cristaux purifiés, leur étude n'a pas encore été poussée plus loin, mais fera, je l'espère l'objet d'un travail ultérieur.

La seule conclusion certaine au sujet de ces cristaux est qu'ils sont constitués par un ou plusieurs esters de cholestérol dont le

ou les acides ont des nombres d'atomes de carbone voisins de 14 ou 16 dans leur molécule.

Les autres esters stériques restent en solution dans l'alcool qui a servi à précipiter A² et seront étudiés ultérieurement.

**Etude des composés passant en solution dans l'alcool
lors de la précipitation de A² par l'alcool à 87° C. froid.**

L'alcool qui baigne les précipités étudiés ci-dessus est séparé par centrifugation ⁽¹⁾ puis évaporé à basse température par distillation sous pression très faible. Lorsque le volume est déjà très réduit, il apparaît un précipité blanc légèrement teinté de vert. Lorsqu'il ne reste plus que quelques centimètres cubes de liquide hydro-alcoolique mouillant cet abondant précipité, l'évaporation est arrêtée et le résidu est repris par de l'éther qui dissout entièrement le précipité en se colorant en brun-vert. La solution étherée est séparée par décantation de l'eau alcoolisée sous-jacente qui est épuisée une deuxième fois par l'éther. Les solutions étherées réunies sont lavées à l'eau puis évaporées à froid dans le vide ; le résidu est repris par de l'éther anhydre.

La solution étherée ainsi obtenue est versée dans un excès d'acétone contenant un peu de chlorure de magnésium ⁽²⁾ ; il apparaît un abondant précipité blanc de phosphoaminolipides qui est séparé par centrifugation et purifié par la série d'opérations suivantes :

1° Dissolution dans l'éther en présence d'eau acidulée par de l'acide chlorhydrique ;

2° Nouvelle précipitation par l'acétone suivie de dissolution dans l'éther ;

3° Traitement par la méthode de Mlle LE BRETON ⁽³⁾ pour enlever les composés carnithiniques d'ailleurs à peine décelables dans le cas présent ;

⁽¹⁾ Pour s'assurer que les protéides sont totalement dénaturés et précipités il faut vérifier sur un petit volume que la chaleur ne fait pas apparaître de coagulum.

⁽²⁾ Cf. MAC LEAN. *Lecithin and allied substances*, 1 vol. Longman Green et Cie, Londres, 1918.

⁽³⁾ Mlle LE BRETON. *Bulletin de la Société de chimie biologique*, novembre 1921, 3, p. 539 à 546. Cette méthode consiste à émulsionner les phosphatides dans de l'eau, puis à les en extraire par de l'éther en présence d'acétone qui favorise cette extraction.

4° Reprisé par l'éther anhydre ;

5° Dessiccation jusqu'à poids constant dans le vide sulfurique dans un pèse-filtre bouchant bien, car la lécithine est très hygroscopique.

La lécithine ainsi obtenue est soumise à l'analyse.

Teneur en phosphore : 3,81 0/0.

Teneur en acides gras : 68,92 0/0.

Rapport $\frac{N}{P} = 0,459$.

Pour la saponification de 0 gr. 4134 de ces acides gras il a fallu une quantité de soude correspondant à 15 cm³ 95 de solution décimale, ce qui correspond à un poids moléculaire moyen de 264 en admettant que ces acides sont monobasiques.

Pour une lécithine oléopalmitique les chiffres théoriques sont :

Teneur en phosphore : 3,84 0/0.

Teneur en acides gras : 69,06 0/0.

Rapport $\frac{N}{P} = 0,451$.

Poids moléculaire moyen des acides gras : 269.

Il y a concordance très acceptable avec les chiffres trouvés ci-dessus.

La détermination de l'indice d'iode des acides gras prouve la présence de liaisons éthyléniques, mais, par suite des oxydations possibles au cours des nombreuses opérations qui précéderent l'isolement de ces acides gras à partir du sérum, le résultat obtenu ici ne peut être que qualitatif.

Tout semble démontrer que la lécithine rencontrée ici est de la lécithine ordinaire, oléopalmitique, contenant très peu de céphaline car elle est intégralement soluble dans l'alcool.

Il est à noter de plus que, dès la première précipitation par l'acétone, les impuretés accompagnant cette lécithine étaient peu abondantes, les composés carnithiniques séparés par la méthode de Mlle LE BRETON étaient à peine décelables.

L'acétone garde par contre en solution d'importantes quantités de substances diverses.

Etude des substances solubles dans l'acétone. — L'acétone qui a servi à précipiter la lécithine est évaporée à sec dans le vide à très basse température, le résidu, coloré en brun-vert, est repris par de l'éther anhydre qui le dissout très bien.

L'éther évaporé laisse un résidu contenant encore, suivant les cas, de 1,3 à 1,7 0/0 de phosphore, mais pas trace d'acide phosphorique libre ni de phosphates minéraux ionisables.

Cet extrait contient un peu de cholestérol libre, beaucoup d'esters oléique et palmitique de cholestérol et de petites quantités de glycérides :

H. MACLEAN, en étudiant les phospholipides du cœur ⁽¹⁾, a montré qu'au cours de la précipitation des phospholipides par l'acétone à partir d'un mélange de graisses et de phospholipides, il reste de la lécithine en solution dans l'acétone, même en présence de cations bivalents.

Un phénomène analogue s'observe ici : il reste des phospholipides dans l'acétone et le résidu d'évaporation de cet acétone est assez riche en phosphore (1,6 0/0 en moyenne).

Pour s'assurer de ce fait, le résidu d'évaporation de l'acétone fut dissous dans le moins possible d'éther et la solution versée dans un grand excès d'acétone contenant des traces de chlorure de magnésium ; le précipité apparu fut centrifugé après six heures et la solution acétonique limpide évaporée par distillation sous pression très réduite à basse température. Le résidu sec ne contenait plus que 0,6 0/0 de phosphore.

Cet ensemble d'opérations fut répété trois fois et le résidu définitivement soluble dans l'acétone ne contenait plus que des traces indosables de phosphore.

Sa composition était la suivante :

Cholestérol libre : 41,95 0/0.

Cholestérol à l'état d'esters : 32,95 0/0.

Acides gras totaux : 55,43.

Glycérol : traces non dosées.

Le poids moléculaire moyen des acides gras, déterminé par titration est 275.

En admettant que les poids moléculaires moyens des acides gras combinés au cholestérol, d'une part, et des acides gras libres ou combinés au glycérol, d'autre part, soient égaux, on peut calculer les résultats suivants :

(¹) MAC LEAN. On the so-called « Acétone-soluble Phosphatides ». *Biochemical Journal*, 8, p 453 (1914).

Cholestérol libre	41,95 0/0
Esters de cholestérol	54,90 »
Acides gras non combinés au cholestérol	31,95 »
Total	98,80

Une très petite quantité de glycérol a été décelée qualitativement et doit s'ajouter à ce total.

Les précipités successifs obtenus par l'acétone furent réunis, dissous dans l'éther et précipités par l'acétone pour les purifier ; ils étaient bien constitués par des phospholipides car leur analyse donne les résultats suivants :

Teneur en phosphore : 3,82 0/0.

Teneur en azote : 4,78 0/0.

Rapport $\frac{N}{P} = 0,465$, théorie 0,452.

Il est à remarquer que, dans le cas présent, on ne rencontre pas en quantité sensible les impuretés azotées dénommées carnithine par MacLEAN ⁽¹⁾ et qui accompagnent généralement les phospholipides extraits des tissus ; peut-être ces composés ont-ils été éliminés au cours des séries de fractionnements qui ont permis d'obtenir la fraction A² étudiée ici, peut-être aussi existent-ils en quantité moins notable dans le sang que dans les tissus.

En résumé. — La richesse en phosphore de la fraction A² s'explique par la présence de quantités importantes de phospholipides. Dans la fraction A² se trouvent également de notables quantités d'acides gras et de cholestérol (en partie combinés d'ailleurs à l'état d'esters cholestériques).

L'alcool fort ne précipite pas instantanément les protéides si la solution est assez alcaline et peu concentrée en protéides.

L'action suffisamment prolongée de l'alcool précipite complètement les protéides à l'état de coagulum insoluble dans l'eau ; parallèlement se précipitent certains esters de cholestérol sous forme de fines aiguilles cristallines.

L'alcool précipite instantanément les solutions concentrées de A² ; la précipitation n'est jamais quantitative, le précipité est en grande partie soluble dans l'eau et contient encore beaucoup de lécithine. Si le contact avec l'alcool se prolonge, le précipité devient insoluble dans l'eau et n'est plus constitué que par des protéides dénaturés débarrassés des phospholipides.

⁽¹⁾ Mac LEAN. Die Phosphatide des Hertzens und anderer organe. *Biochemische Zeitschrift*, 57, p. 132 (1913).

Etude de l'épuisement par l'éther des solutions aqueuses de A²

1° 20 centimètres cubes d'une solution de A² sont traités par 200 cm³ d'alcool absolu, à l'ébullition, dans une atmosphère de gaz carbonique; le coagulum est recueilli dans une cartouche de papier filtre, puis épuisé dans un appareil de KUMAGAWA et SUTO par l'alcool absolu pendant une journée entière. L'extraction est ensuite poursuivie pendant une autre journée avec de l'éther ordinaire. Les solutions alcooliques et éthérées sont évaporées à sec à basse température dans un vide très poussé. Le résidu sec est repris par de l'éther anhydre, la solution filtrée est évaporée; le résidu desséché jusqu'à poids constant dans le vide en présence d'acide sulfurique pèse 0 gr. 579.

2° 20 centimètres cubes de la même solution (pH=8) de A² sont placés dans une boule à décantation avec 20 centimètres cubes d'éther, l'ensemble est agité énergiquement toutes les heures pendant huit heures puis laissé en repos jusqu'au lendemain matin. L'éther séparé par décantation est évaporé à sec dans une fiole de Fourneau tarée. Le liquide aqueux soutiré est traité à nouveau, dans les mêmes conditions, par 20 cm³ d'éther et, chaque jour, le produit total de l'extraction éthérée est pesé.

Après sept journées d'extraction par l'éther, le poids total des substances extraites est seulement 0 gr. 045. Or nous avons vu que les 20 cm³ de solution de A² contenaient 0 gr. 579 de lipides pouvant être extraits par la méthode de KUMAGAWA et SUTO (alcool bouillant et éther bouillant); il reste donc dans la solution aqueuse de A² 0 gr. 534 de lipides qui n'ont pu être extraits par sept épuisements par l'éther à la température ordinaire, soit 92,20/0.

Le tableau suivant donne les poids totaux des substances extraites après chacune des journées d'extraction par l'éther.

Durée en jours de l'extraction par de l'éther renouvelé chaque jour	Poids totaux des substances extraites par l'éther
1.	0 gr. 0167
2.	0 gr. 0244
3.	0 gr. 0314
4.	0 gr. 0353
5.	0 gr. 0384
6.	0 gr. 0422
7.	0 gr. 0450

La courbe ci-contre n° 1 schématise ces résultats ; en abscisses sont portées les journées d'extraction et en ordonnées les quantités totales de substances extraites par l'éther (en milligrammes).

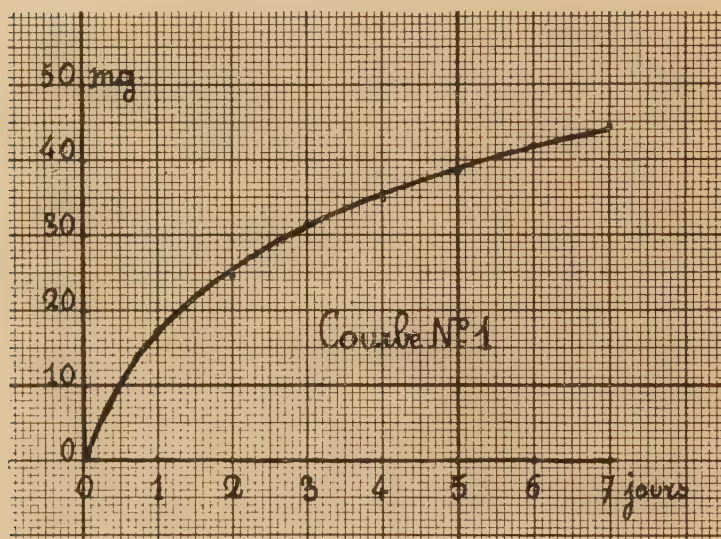


Fig. 4.

La courbe n° 2 se rapporte à la même expérience, les abscisses sont les mêmes que pour la courbe n° 1, mais les ordonnées sont calculées pour 100 des lipides totaux contenus dans la solution de A² ; cette courbe fait bien ressortir la petitesse des quantités de substances enlevées par l'éther à la solution de A².

Il était important de savoir quelles étaient les substances qui se laissent ainsi extraire en petites quantités par l'éther ; dans ce but l'extract éthéré total fut analysé et les résultats obtenus furent les suivants :

Phosphore : trace indosable, moins de 0,02 0/0.

Cholestérol total après saponification, 65,5 0/0.

Acides gras totaux après saponification, 27,0 0/0.

Etant donnée la petitesse du poids de substance disponible, ces chiffres ne peuvent être qu'approximatifs.

Un fait certain apparaît néanmoins : aucune quantité apprécia-

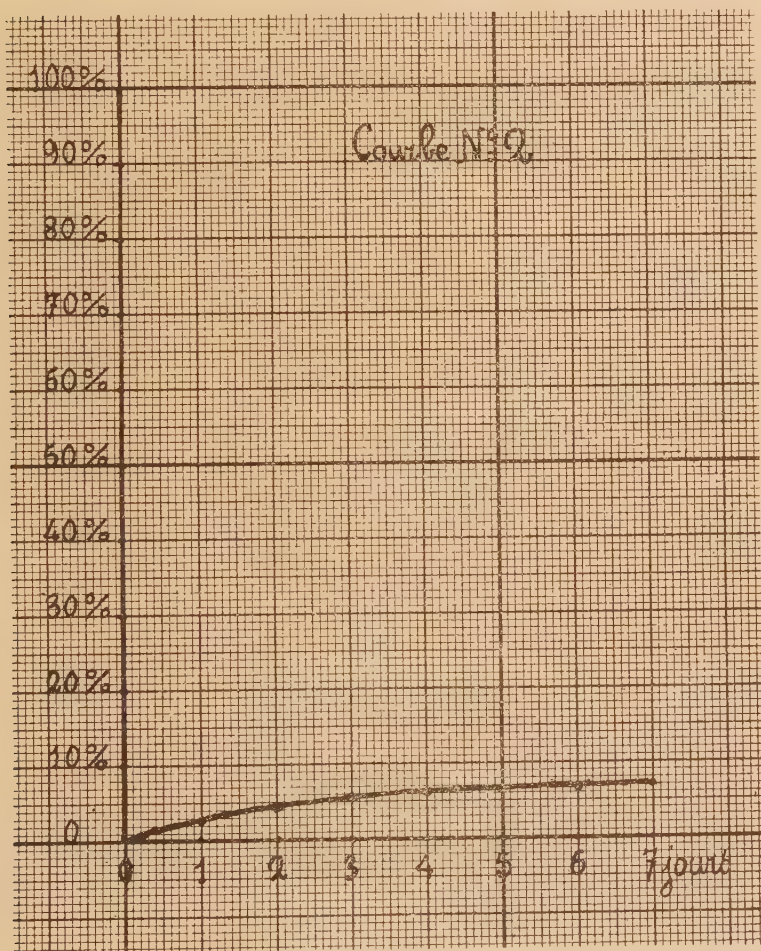


Fig. 5. — Quantités de substances extraites par l'éther pour 100 de lipides totaux.

ble de lécithine ou d'autre phospholipide n'a pu être extraite par l'éther de la solution de A² qui est cependant si riche en phospholipides.

Existe-t-il des liaisons chimiques ou physicochimiques entre

les lipides et les protéides qui se sont ainsi rassemblés dans cette fraction A^2 ? Est-il possible de les séparer en poussant plus avant le fractionnement ? Existe-t-il au contraire une limite à ce fractionnement ? C'est pour essayer d'éclaircir ces questions que le fractionnement de A^2 a été entrepris.

Fractionnement de la fraction A².

Comme l'a montré l'étude précédente, la fraction A² contient de l'albumine, de la lécithine, et des éthers de cholestérol. Certaines des propriétés de chacun de ces constituants sont masquées ou modifiées : l'albumine ne précipite pas par l'alcool fort, mais précipite par acidification légère, la lécithine et les éthers cholestériques ne sont pas extraits par l'éther, même en présence de sels neutres, mais sont précipités par de l'alcool ajouté sans excès.

Ces phénomènes sont-ils dus au simple voisinage des trois constituants ou à des liaisons plus intimes les réunissant ? Est-il possible de les séparer par fractionnement en évitant toute action brutale capable de rompre leurs liaisons possibles ? Y a-t-il au contraire une limite à ce fractionnement ?

C'est pour essayer de répondre à ces diverses questions que le fractionnement de A² a été poussé jusqu'à l'obtention de 14 fractions.

Le principe de ce fractionnement a déjà été indiqué page 28.

Douze litres environ de sang de cheval défibriné ⁽¹⁾ sont, le plus rapidement possible, centrifugés, le sérum est décanté avec soin, une partie est prélevée pour analyses et quatre litres utilisés pour l'étude qui va suivre.

Aux 4.000 cm³ de sérum sont ajoutés 4.000 cm³ d'une solution saturée à 15° et neutre de sulfate d'ammonium. Après quelques heures à la glacière, les globulines sont séparées par essorage à la trompe sur papier Chardin. Au liquide recueilli (7.260 cm³) sont ajoutés 500 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium (ce qui provoque l'apparition d'un léger louche persistant à l'agitation), puis 270 cm³ d'une solution normale d'acide sulfurique pour amener le pH à 3,8. Après 24 heures de repos dans une salle froide (+ 10° C.) le précipité est recueilli par essorage

(1) Ce sang provient de trois chevaux sains de trois, cinq et sept ans abattus aux abattoirs hyppophagiques.

à la trompe sur papier Chardin et débarrassé autant que possible de son eau-mère, puis il est dissous par 400 cm³ d'eau et 45 cm³ d'une solution d'ammoniaque 2,30 N ⁽¹⁾. Le volume total de la solution ainsi obtenue est 805 cm³.

La fraction A est précipitée par 103,5 cm³ de solution normale d'acide sulfurique correspondant aux 45 cm³ de la solution d'ammoniaque employés pour dissoudre.

Après deux heures de repos, la fraction A est recueillie par centrifugation, puis dissoute dans 200 cm³ d'eau grâce à la quantité de la solution 2,30 N d'ammoniaque nécessaire pour amener le pH à 8,00 soit 30 cm³. La solution ainsi obtenue est filtrée pour éliminer quelques fibres de papier Chardin entraînées, son volume est 590 cm³ dont 25 cm³ sont prélevés pour les dosages, il reste 565 cm³, soient les $\frac{565}{590}$ de l'ensemble ; la fraction A' est donc précipitée par le volume de solution normale d'acide correspondant aux $\frac{565}{590}$ de la quantité d'ammoniaque utilisée pour dissoudre la fraction A soient 69 cm³.

Pour dissoudre A' on emploie, non plus 200 cm³ d'eau et 30 cm³ d'ammoniaque, mais $\frac{565}{590} \cdot 200 = 190$ cm³ d'eau et $\frac{565}{590} \cdot 30 = 28,75$ cm³ d'ammoniaque. De la solution ainsi obtenue sont prélevés pour des dosages 30 cm³ ; or le volume total était 415 cm³ ; A² est donc précipité par la quantité d'acide correspondant à $\frac{385}{415} \cdot 30$ cm³ d'ammoniaque 2,3 N soient 57,08 cm³ d'acide normal.

A² est ensuite dissous dans $\frac{385}{415} \cdot 190 = 176,2$ cm³ d'eau et $\frac{385}{415} \cdot 28,75 = 26,67$ cm³ d'ammoniaque.

Toutes les précipitations et dissolutions successives sont ainsi faites par des quantités d'acide, d'eau et d'ammoniaque calculées en tenant compte des prélèvements pour les dosages.

De chacune des solutions de A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸ sont prélevés :

1° 10 cm³ pour le dosage du cholestérol et des acides gras totaux ;

⁽¹⁾ Cette solution d'ammoniaque était titrée par de l'acide normal utilisé en employant comme indicateur le rouge de méthyle amené au rouge cerise (pH 3,9).

2° Deux fois 2 cm³ pour deux dosages parallèles du phosphore entraîné par le précipité trichloracétique ; ces précipités trichloracétiques sont, au cours de ces dosages, séchés et pesés, ce qui permet de calculer pour chacune des fractions :

a) La teneur en phosphore 0/0 de précipité trichloracétique ;
b) La teneur en acides gras totaux 0/0 de précipité trichloracétique ;

c) La teneur en cholestérol total 0/0 de précipité trichloracétique ;

d) Le rendement des précipitations successives, c'est-à-dire la quantité totale de substances précipitables par l'acide trichloracétique qui aurait été précipitée s'il n'y avait pas eu de prélèvement pour les analyses.

Pour la fraction A, il a été de plus prélevé 6 cm³ et pour la fraction A¹ 11 cm³ pour d'autres analyses.

Voici un tableau indiquant les quantités d'eau, de solution d'ammoniaque 2,30 N, et de solution d'acide sulfurique normale utilisées pour toutes ces opérations ainsi que les volumes des solutions obtenues et les volumes prélevés pour les analyses.

Désignation des fractions	Volumes utilisés pour la dissolution		Volume de la solution obtenue	Prélèvements pour les analyses	Volume restant pour la suite du travail	Volume d'acide N utilisé pour précipiter la fraction suivante
	Eau	Ammo- niaque				
A	200 cm ³	30 cm ³	590 cm ³	25 cm ³	365 cm ³	69 cm ³
A ¹	190 »	28,75 »	415 »	30 »	385 »	57,08 »
A ²	176,2 »	26,67 »	282 »	14 »	268 »	54,24 »
A ³	167,4 »	25,34 »	240 »	14 »	226 »	51,06 »
A ⁴	157,7 »	23,86 »	220 »	14 »	206 »	47,81 »
A ⁵	147,6 »	22,34 »	203,5 »	14 »	189,5 »	44,52 »
A ⁶	136,7 »	20,69 »	188 »	14 »	174 »	39,91 »
A ⁷	126,5 »	19,15 »	173 »	14 »	159 »	37,66 »
A ⁸	116,3 »	17,60 »	158,5 »	17 »	141,5 »	34,05 »

Les dosages furent effectués avec les techniques suivantes :

1° *Dosage du phosphore.* — 2 cm³ de la solution sont dilués par 6 cm³ d'eau distillée puis additionnés de 2 cm³ d'une solution aqueuse à 20 0/0 d'acide trichloracétique pur. Après quelques minutes le précipité est rassemblé par une centrifugation

énergique (10 minutes à 6.000 tours-minute). Le liquide surnageant est décanté avec soin puis le tube est renversé dans un verre à pied pour que les eaux-mères s'égouttent. Après une heure le tube est mis dans une étuve à 90° où il séjourne jusqu'au lendemain. Après refroidissement dans un dessiccateur, le précipité est pesé à la balance de précision en évitant toute hydratation, car il est un peu hygroscopique et prend assez rapidement 1 ou 2 0/0 d'eau.

Après la pesée, les matières organiques sont détruites par chauffage prolongé avec 1 cm³ exactement mesuré d'acide sulfurique et 10 cm³ environ d'acide nitrique fumant. Si l'acide nitrique s'élimine complètement avant que toutes les matières organiques soient détruites, le liquide brunit, puis noircit, il faut aussitôt éteindre la flamme, laisser refroidir et ajouter un peu d'acide nitrique pour éviter toute perte possible de phosphore par chauffage en présence de charbon dans un milieu peu oxydant. Lorsque, après le départ des vapeurs nitreuses, le liquide reste incolore, la destruction est terminée.

Le dosage de l'acide phosphorique est effectué sur le résidu par la méthode que j'ai décrite dans le *Bulletin de la Société de chimie biologique*, tome VII, numéro 5, pages 464 à 469 (mai 1926) et dont voici le principe :

1° Hydrolyse des pyrophosphates qui ont pu se former pendant la destruction des matières organiques.

2° Précipitation de l'acide phosphorique à l'état de phosphomolybdate d'ammonium dans des conditions déterminées toujours identiques : mêmes concentrations en tous les réactifs, mêmes conditions de chauffe pour que la constitution du précipité soit toujours comparable et sa teneur en ammoniac rigoureusement parallèle à la quantité de phosphore.

3° Addition d'alcool pour abaisser la tension superficielle et éviter le « grimpage » du précipité.

4° Séparation du précipité par filtration sur un petit filtre d'amiante muni d'un siphon aspirateur évitant les pertes possibles par transvasements (voir schéma ci-contre) (fig. 6).

5° Lavages répétés par de l'alcool à 50 0/0.

6° Dissolution du phosphomolybdate d'ammonium dans un excès d'une solution diluée d'ammoniaque (environ 2 fois normale).

7° Ebullition en présence d'un excès d'une solution normale au vingt-cinquième de soude ajoutée en quantité connue. L'ammoniac en excès est chassé par l'ébullition et l'ammoniac combiné à l'état de phosphomolybdate est déplacé par la soude et chassé également par l'ébullition.

8° Addition d'un volume d'acide sulfurique normal au vingt-cinquième rigoureusement correspondant à la soude utilisée dans l'opération précédente.

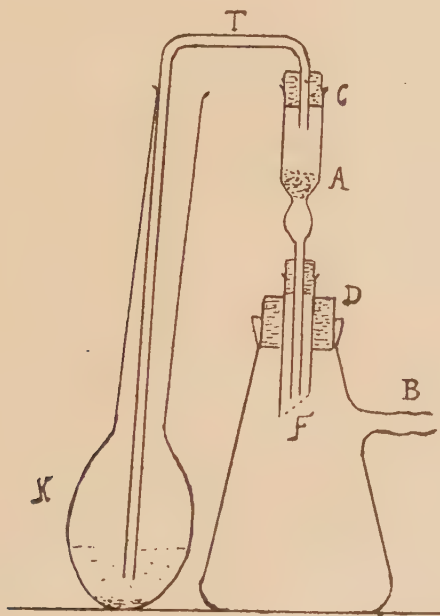


Fig. 6.

9° Ebullition pour chasser le gaz carbonique.

10° Titrage par de la soude normale au vingt-cinquième de l'excès d'acide en présence de phénolphtaléine. Le volume de solution de soude utilisé pour ce titrage correspond à la soude qui a servi à déplacer l'ammoniac combiné à l'état de phosphomolybdate. Un centimètre cube de soude normale au vingt-cinquième correspond à 0 mg. 0448 de phosphore.

Pour un milligramme de phosphore il faut donc 22,32 cm³ de solution titrée, le virage est très sensible, la méthode est donc

très précise et dans les dosages effectués au cours de ce travail, les quantités de phosphore étaient de l'ordre du milligramme toujours supérieures au demi-milligramme. Les volumes de solution titrée variaient de 12 à 23 cm³, les erreurs relatives ne dépassaient pas 1,5 0/0.

2° *Dosage des acides gras et du cholestérol.* — 10 cm³ de la solution sont introduits avec 20 cm³ de lessive de soude dans une fiole de Fourneau placée dans de l'eau bouillante. La fiole est laissée débouchée pour permettre l'évaporation lente de l'eau. Après deux heures sont ajoutés 20 cm³ d'alcool fort, puis la saponification est poursuivie pendant encore une demi-heure. Le résidu pâteux est versé dans une boule à décantier, puis la fiole est lavée à l'eau bouillante. Après addition d'un excès d'acide chlorhydrique et refroidissement, la solution est épuisée à trois reprises par de l'éther; les solutions étherées sont lavées à l'eau distillée dans une autre boule à décantier, puis évaporées à sec et le résidu repris par de l'éther anhydre. La solution, filtrée sur coton dégraissé, est recueillie dans une fiole tarée, l'éther évaporé; le résidu séché et pesé correspond à l'ensemble acides gras totaux plus insaponifiable total.

Suivant les modifications apportées par M. P. LEMELAND ⁽¹⁾ à la technique de KUMAGAWA et SUTO et, pour éviter l'autoxydation de certains acides gras non saturés et la volatilisation d'une partie des composés insaponifiables autres que le cholestérol, les dessiccations sont effectuées au dessiccateur à vide en présence d'acide sulfurique à la température ordinaire après simple ébullition de l'éther dans un bain-marie pendant le temps strictement nécessaire pour chasser l'éther. L'extrait étheré pesé est traité par un léger excès de potasse alcoolique, à l'ébullition, au réfrigérant ascendant pendant une dizaine de minutes, puis refroidi et additionné d'éther de pétrole; le mélange, homogène, est versé dans une boule à décantier et additionné d'un volume d'eau égal au volume de potasse alcoolique utilisée; l'éther de pétrole se rassemble en surface, il est séparé par décantation. La solution hydroalcoolique est épuisée une autre fois par de l'éther de pétrole, les solutions pétroliques sont rassemblées, lavées à l'eau

(1) M. P. LEMELAND, Recherches chimiques et physiologiques sur le dosage des lipoides. *Bulletin de la Société de chimie biologique*, tome IV, n° 6, pages 300-320 (1922) et *Ibid.*, tome V, n° 2, page 110 (1923).

distillée, puis évaporées suivant la technique de LEMELAND et l'insaponifiable est pesé.

Les acides gras sont obtenus par différence entre les poids de l'extrait éthéré total et de l'insaponifiable total.

Dans plusieurs dosages, l'insaponifiable fut repris à chaud par le solvant hydro alcoolo-acétonique de CAMINADE⁽¹⁾, puis additionné de la quantité calculée de solution de digitonoside à 0,5 0/0 dans ce même solvant. Le complexe de WINDAUS fut recueilli et pesé. Il a été ainsi possible de vérifier que pour les fractions successives A¹, A², A³, A⁴, le cholestérol était de moins en moins souillé par des composés insaponifiables autres que le cholestérol. Pour A⁴ la différence entre le cholestérol dosé par la méthode WINDAUS-CAMINADE et l'insaponifiable total était déjà de l'ordre des erreurs d'expériences ; dans les tableaux et courbes qui vont suivre, les chiffres indiqués pour le cholestérol sont donc ceux obtenus par simple pesée de l'insaponifiable total.

Les dosages de phosphore et de cholestérol correspondant à la fraction A⁵ ont été perdus par accident mais les pesées du précipité trichloracétique et de l'extrait éthéré total étaient déjà faites et figurent dans le tableau suivant qui résume tous les résultats obtenus pour toutes les fractions successives.

Fractions	Rendements des précipitations	Phosphore pour cent	Cholestérol pour cent	Acides gras pour cent	Acides gras + cholestérol pour cent	Rapport cholestérol ac. gras
A	53,4	0,26	5,9	7,50	13,4	0,786
A ¹	25,35	0,50	8,7	13,0	21,6	0,669
A ²	13,66	0,76	12,6	21,1	33,7	0,597
A ³	11,98	0,86	13,3	25,0	38,3	0,532
A ⁴	10,65	0,945	13,5	27,8	41,3	0,486
A ⁵	10,42	—	—	—	41,7	—
A ⁶	9,83	1,09	13,7	29,6	43,3	0,463
A ⁷	9,80	1,11	14,2	29,5	43,7	0,481
A ⁸	9,63	1,10	14,2	30,6	44,8	0,464

L'ensemble de ces résultats est schématisé par les courbes suivantes :

⁽¹⁾ CAMINADE, *Bul. Soc. chim. biol.*, 4, p. 601-613 (1922).

1° COURBE DES RENDEMENTS. — En abscisses sont portées les désignations des fractions successives représentées conventionnellement par des points équidistants.

En ordonnées sont portés les poids (en grammes) de précipité

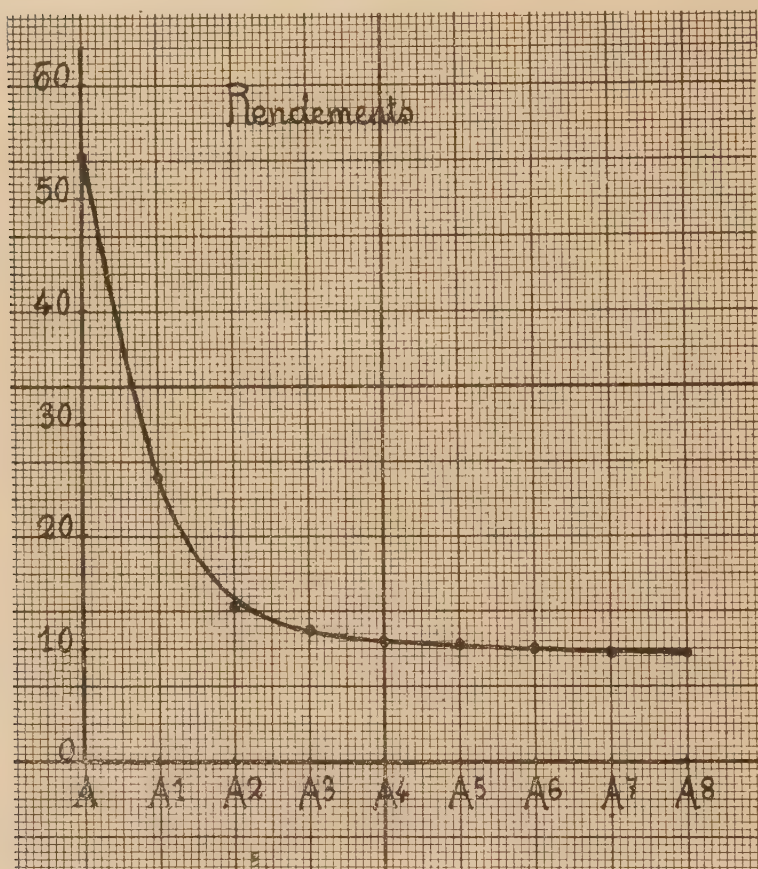


Fig. 7.

trichloroacétique total qu'aurait pu fournir chacune des fractions s'il n'y avait pas eu de prélèvement pour analyses dans les précipitations antérieures.

Ces chiffres sont obtenus par calcul après pesée du précipité trichloroacétique sec fourni par 2 cm³ de solution de la fraction correspondante. Pour ce calcul il faut tenir compte, d'une part,

du volume total de cette solution et, d'autre part, des portions prélevées sur chacune des fractions précédentes.

Cette courbe montre clairement que la précipitation de A^1 à partir de la solution de A laisse beaucoup de substances dans les eaux mères (fraction α^1), mais que la quantité de matière ainsi laissée dans les eaux-mères décroît très rapidement pour devenir presque nulle à partir de A^4 .

Les eaux-mères des dernières fractions contiennent seulement quelques traces d'albumine.

En résumé. — Il y a une limite à la séparation par dissolutions et précipitations successives par variations de la concentration des ions hydrogène : après quatre opérations successives, à partir de la fraction A, on obtient un ensemble qui se précipite à peu près quantitativement dans les opérations ultérieures.

2° COURBE DES TENEURS EN PHOSPHORE. — Les abscisses sont les mêmes que pour la courbe précédente, en ordonnées sont portées les teneurs pour cent en phosphore des précipités trichloracétiques.

Ici aussi une limite est atteinte, mais un peu plus tardivement que pour la courbe précédente (fig. 8).

L'observation suivante peut expliquer cette ascension plus lente de la courbe des teneurs en phosphore : en calculant la quantité totale de phosphore précipitée au cours des précipitations successives, en étudiant, en somme, le rendement en phosphore, on constate que tout le phosphore n'est pas précipité dans les premières opérations mais que la quantité de phosphore laissée dans les eaux-mères décroît très rapidement. Dès la quatrième précipitation tout le phosphore est précipité, la purification n'en fait plus perdre.

Le rendement en phosphore se calcule en effectuant le produit de deux chiffres obtenus expérimentalement, il ne faut donc pas compter sur plus de deux chiffres significatifs. Voici, exprimés en grammes les résultats de ces calculs :

Fractions. . . .	A	A^1	A^2	A^3	A^4	A^5	A^6	A^7	A^8
Phosphore total. .	0,44	0,42	0,40	0,40	0,41	»	0,41	0,41	0,40

Le quart, environ, du phosphore se perd entre A et A^3 , des impuretés phosphorées s'éliminent rapidement, puis tout le

phosphore restant passe dans toutes les fractions suivantes. Ceci permet de comprendre que les courbes du rendement total et de la teneur en phosphore ne soient pas exactement inverses.

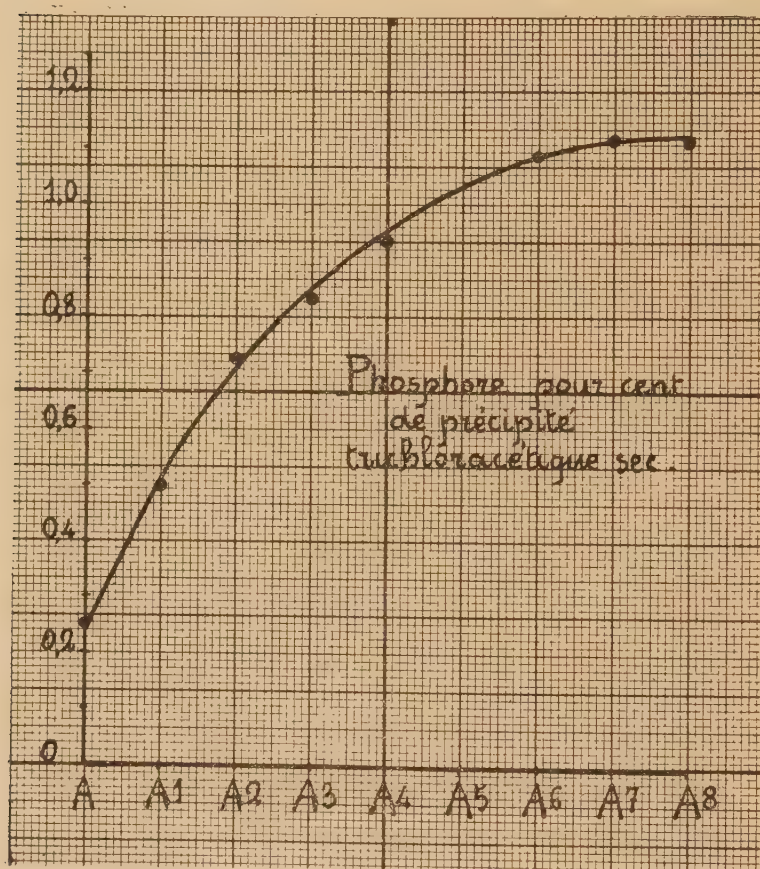


Fig. 8.

3° COURBE DES TENEURS EN CHOLESTÉROL. — En abscisses sont portées les mêmes indications que pour les autres courbes.

En ordonnées sont portées les teneurs pour cent en insaponifiable total des précipités trichloracétiques des diverses fractions (fig. 9).

Pour la teneur en cholestérol des fractions successives, il y a

donc, comme pour la teneur en phosphore, une limite, mais elle est très rapidement atteinte ; et, tandis que la teneur en phosphore varie, au cours des précipitations successives, du simple au quadruple, la teneur en cholestérol des dernières fractions n'atteint même pas deux fois et demie la teneur de la première.

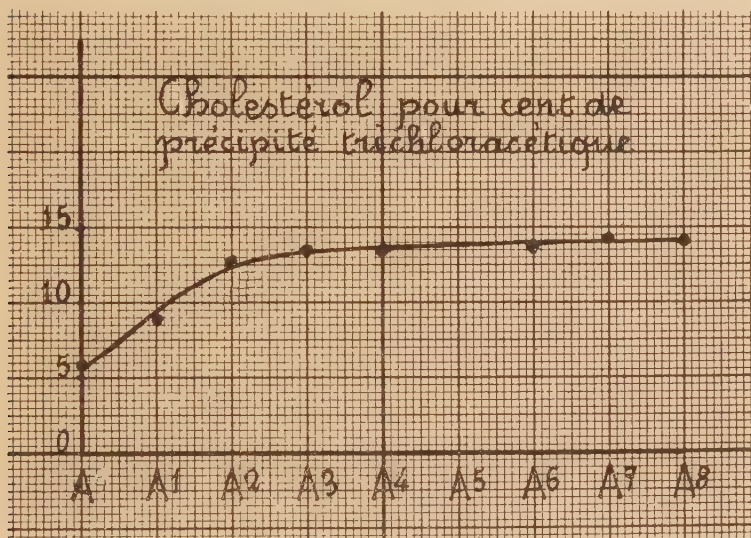


Fig. 9.

Le dosage pondéral de l'insaponifiable est un peu plus fidèle que le dosage volumétrique du phosphore ; aussi les résultats obtenus par calcul pour les rendements en cholestérol sont-ils donnés dans le tableau suivant avec trois chiffres, le dernier pouvant cependant être entaché d'une erreur de quelques unités :

Fractions	Cholestérol total
A	3 gr. 75
A ¹	2 gr. 21
A ²	4 gr. 75
A ³	4 gr. 59
A ⁴	4 gr. 44
A ⁵	—
A ⁶	4 gr. 35
A ⁷	4 gr. 39
A ⁸	4 gr. 35

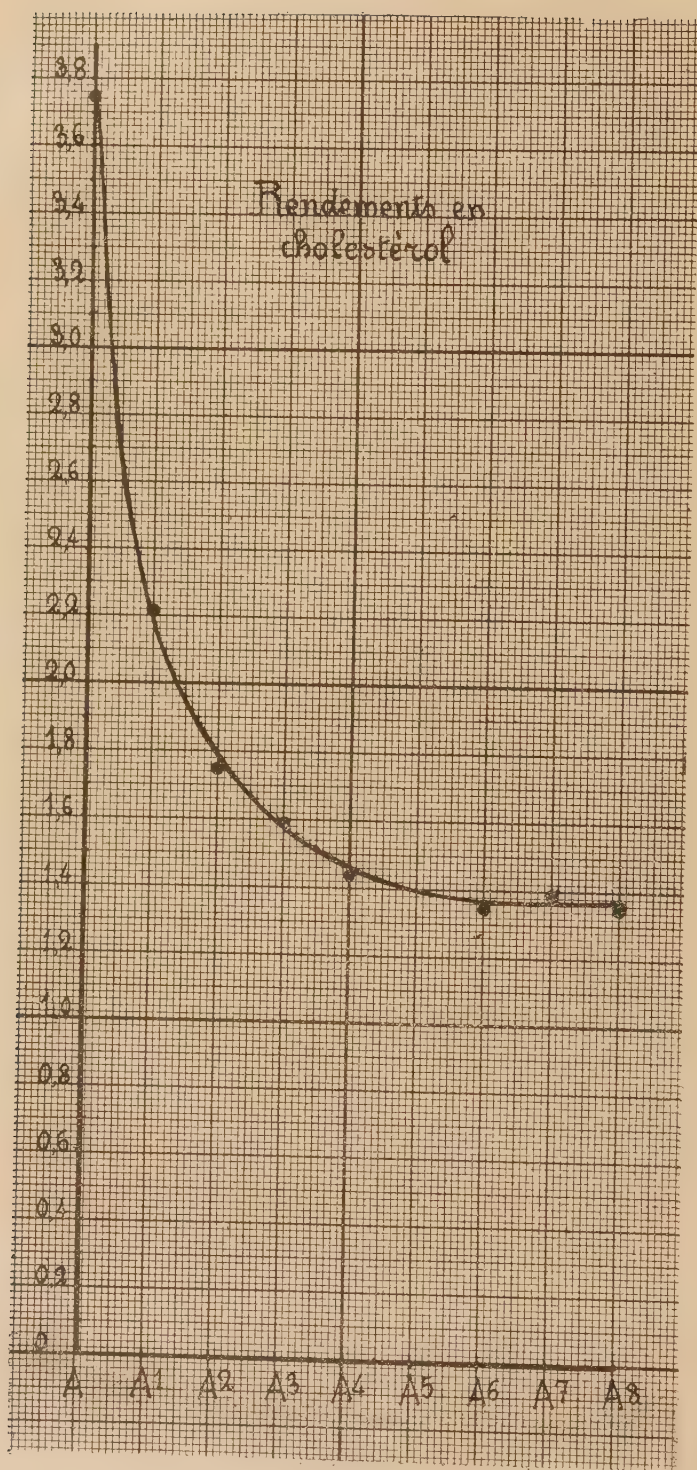


Fig. 10.

La courbe ci-contre schématise ces résultats et montre combien grande est la perte en cholestérol au cours des premières précipitations. Cette courbe montre en outre qu'après quatre précipitations, le cholestérol restant ne se perd plus au cours des précipitations ultérieures qui sont cependant faites dans des conditions, en tout point identiques. Ces faits font supposer la présence dans la fraction A de deux composés cholestériques (au moins) dont l'un s'éliminerait des précipités et l'autre se précipiterait toujours quantitativement (fig. 10).

4° COURBE DES TENEURS EN ACIDES GRAS TOTAUX. — En abscisses sont portées les mêmes indications que pour toutes les autres courbes précédentes (fig. 11).

En ordonnées sont portées les teneurs pour cent en acides gras totaux des précipités trichloracétiques des diverses fractions.

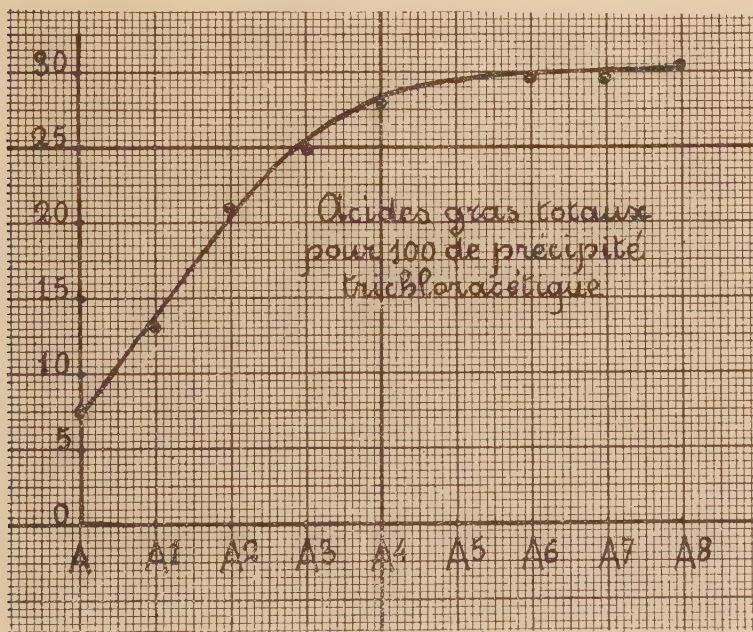


Fig. 11.

Pour la teneur en acides gras il y a donc, comme pour les teneurs en phosphore et en cholestérol, une limite à l'enrichissement des fractions successives.

Les dernières fractions contiennent quatre fois plus d'acides gras que la première. Nous avons déjà vu que les dernières fractions contiennent 4,23 fois plus de phosphore que les premières, mais seulement 2,4 fois plus de cholestérol.

Le dosage des acides gras est, comme celui du cholestérol, un dosage pondéral, mais le résultat est obtenu par différence, le troisième chiffre significatif obtenu dans le calcul du rendement a donc moins de valeur. Voici un tableau donnant les résultats obtenus par ces calculs et une courbe les schématisant (fig. 12) :

Fractions	Acides gras totaux
A	4 gr. 00
A ¹	3 gr. 30
A ²	2 gr. 89
A ³	2 gr. 99
A ⁴	2 gr. 96
A ⁵	—
A ⁶	2 gr. 94
A ⁷	2 gr. 89
A ⁸	2 gr. 92

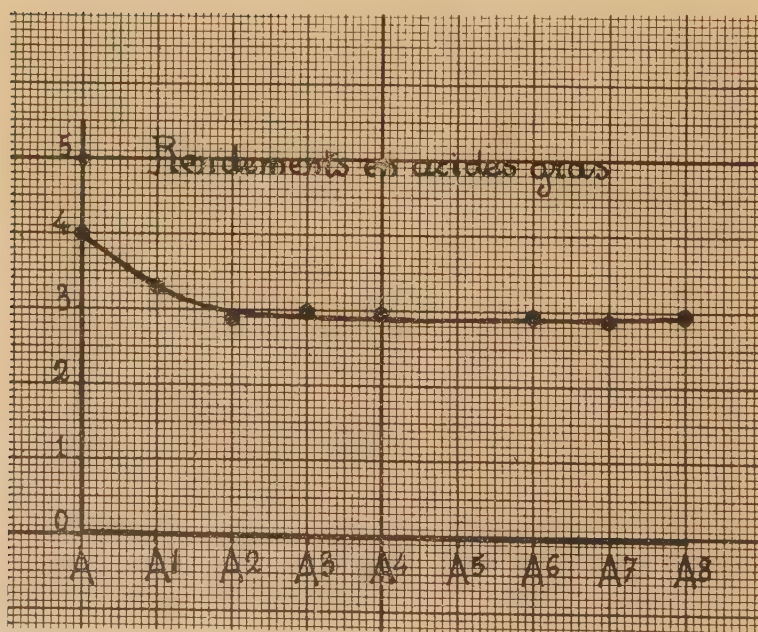


Fig. 12.

Pour comparer les courbes des rendements, pour mieux se rendre compte de leur parallélisme ou de leurs défauts de parallélisme, il faut les tracer avec des coordonnées identiques. Pour cela désignons par 100 la quantité de substances totales précipitables par l'acide trichloracétique dans l'ensemble de la fraction I, par 100 également les quantités de phosphore, de cholestérol et d'acides gras contenues dans l'ensemble de cette fraction A, puis, avec les unités ainsi choisies, calculons les quantités qui auraient été contenues dans les diverses fractions s'il n'y avait pas eu de prélèvements pour analyse. Voici un tableau donnant les résultats de ces calculs :

Rendements calculés pour 100 de ce qui se trouvait
dans la fraction A.

Désignations des fractions	Rendements en :			
	Substances totales	Phosphore	Cholestérol	Acides gras
A	100	100	100	100
A ¹	47,5	86	59,0	82,5
A ²	25,6	72	46,6	72,4
A ³	22,4	72	42,4	74,7
A ⁴	20,0	78	38,4	74,0
A ⁵	19,5	—	—	—
A ⁶	18,4	78	36,0	72,8
A ⁷	18,3	78	37,1	72,4
A ⁸	17,9	72	36,0	73,0

Les quatre courbes ci-contre schématisent l'ensemble de ces résultats et montrent :

1° Un parallélisme parfait entre les courbes correspondant au phosphore et aux acides gras.

2° Une très grande divergence entre les courbes précitées et la courbe correspondant au cholestérol.

3° L'existence d'une limite à chacune des quatre courbes prouvant qu'au cours des dernières précipitations, la composition des précipités reste constante et que tout le cholestérol tout le phos-

phore et tout l'ensemble des acides gras se précipitent quantitativement.

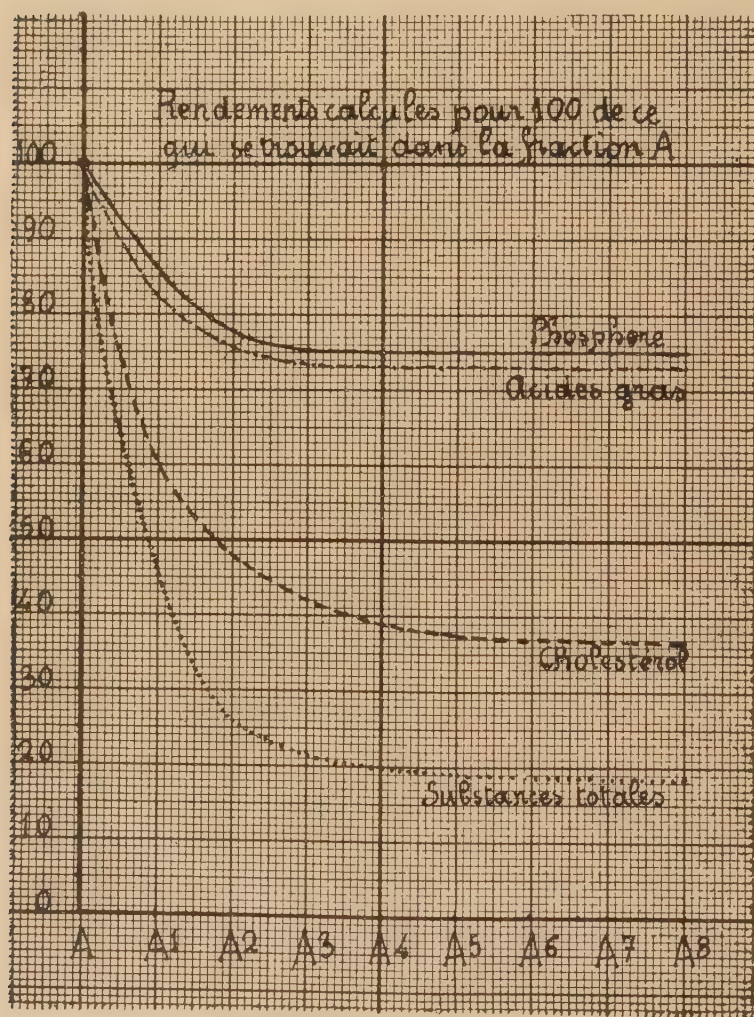


Fig. 13.

5° COURBE DES VARIATIONS DU RAPPORT $\frac{\text{cholestérol}}{\text{acides gras}}$. — En ordonnées sont portées les valeurs du rapport (fig. 14).

Après une baisse régulière, ce rapport se fixe un peu au-dessus de la moitié de sa valeur primitive.

Cette courbe montre encore plus clairement que les précédentes qu'il s'élimine au cours des précipitations successives une proportion beaucoup plus élevée de cholestérol que d'acides gras.

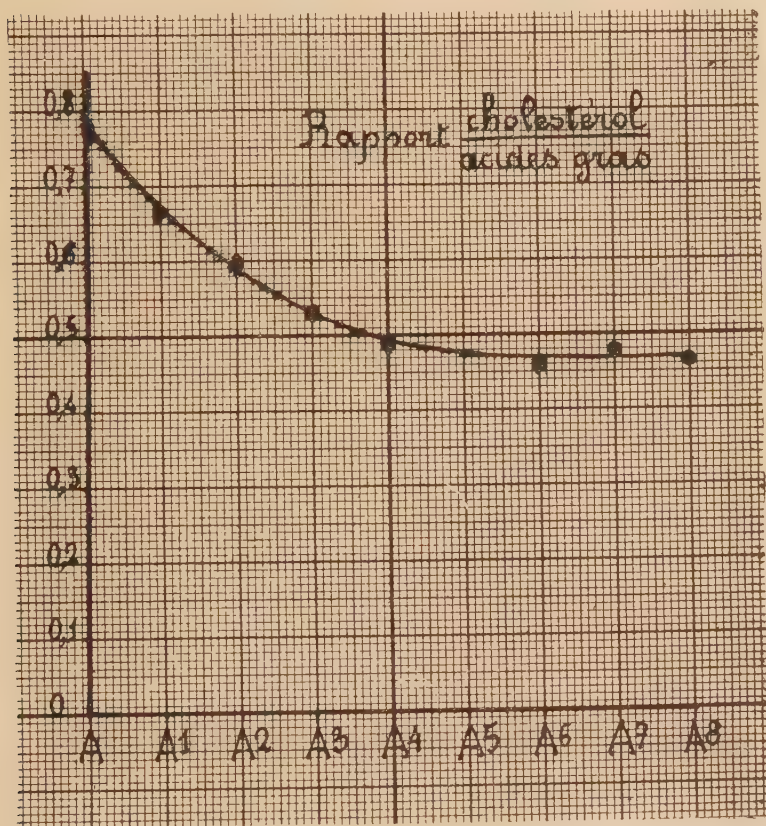


Fig. 14.

Comme toutes les autres, cette courbe tend vers une limite et les dernières précipitations n'affectent plus la valeur du rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{acides gras}}$.

6° TENEURS EN PIGMENTS BILIAIRES. — La fraction A était assez riche en pigments biliaires, le précipité trichloracétique rassemblé par centrifugation était très fortement coloré en vert. Pour se

rendre compte de l'élimination des pigments, un précipité trichloracétique provenant de la fraction A fut conservé en présence de son eau-mère dans un tube bien bouché et tous les précipités trichloracétiques successifs lui furent comparés avant d'être utilisés pour les dosages de phosphore. Cette étude très sommaire a cependant permis de constater que la teinte verte des précipités trichloracétiques diminuait régulièrement d'une fraction à la suivante, pour disparaître dans les dernières fractions dont les précipités trichloracétiques sont presque blancs, très légèrement teintés en jaune très pâle.

Les pigments biliaires s'éliminent donc, semble-t-il, lentement mais assez complètement au cours des précipitations successives.

Les précipités obtenus par acidification à pH 3,7 dans le cours du fractionnement sont toujours colorés en vert, même ceux des dernières fractions ; cette coloration décroît rapidement au cours des premières précipitations, mais très lentement ensuite. Le précipité correspondant à la fraction A⁹ dont il sera parlé ultérieurement est encore teinté nettement en vert pâle. Il est difficile d'expliquer ce fait par la présence de pigments biliaires puisque les précipités trichloracétiques sont à peu près blancs. Aucune hypothèse satisfaisante n'a pu être envisagée sur la nature du pigment colorant ainsi en vert pâle les précipités des fractions même les plus purifiées. En solution (pH > 6,5) ces fractions sont très peu colorées et présentent seulement une très légère teinte jaune.

Etude de la fraction A²

L'étude précédente a montré que par précipitations et redissolutions successives par variations de la concentration des ions H⁺, on obtient un ensemble qui ne peut plus être fractionné par des précipitations ultérieures.

Par huit précipitations, à partir de A¹, a été obtenu un précipité désigné par le symbole A²; ce sont ses propriétés qui vont être examinées dans l'étude qui va suivre.

De la solution de la fraction précédente A², dont le volume était 138,5 cm³, il a été prélevé 17 cm³ pour analyse, le volume restant est donc 141,5 cm³. Pour poursuivre la série des précipitations dans les conditions habituelles, il faudrait dissoudre A² dans $\frac{141,5}{138,5} \cdot 17,6 = 18,72$ cm³ de solution titrée ammoniacale et $\frac{141,5}{138,5} \cdot 116,3 = 104$ cm³ d'eau pour obtenir un volume total de 141 cm³ de solution contenant par centimètre cube :

31,5 mg. de précipité trichloracétique sec
0,346 mg. de phosphore
4,45 mg. de cholestérol
9,54 mg. d'acides gras totaux.

(chiffres prévus par extrapolation).

Mais dans le but d'étudier les propriétés de cet ensemble à différents pH, la dissolution n'est opérée que dans un volume total d'eau et d'ammoniaque inférieur de 8 cm³ au volume calculé ci-dessus, soient : 10 cm³ de solution titrée d'ammoniaque et 101,7 cm³ d'eau.

La solution obtenue est divisée en 4 parties égales; en ajoutant à chacune d'elles 2 cm³ d'eau ou de solution titrée d'acide on ramènera les concentrations en phosphore, acides gras et cholestérol à celles indiquées ci-dessus, mais en employant des solutions acides de titres divers on obtiendra des solutions sem-

blables en tout point sauf quant à la concentration en ions hydrogènes.

A la première portion sont donc ajoutés 2 cm³ d'eau neutre, le pH est 9,00.

A la deuxième portion sont ajoutés 2 cm³ d'une solution environ normale d'acide sulfurique, le pH est 8,52.

A la troisième portion sont ajoutés 2 cm³ d'une solution environ une fois et demie normale d'acide sulfurique, le pH est 6,98.

A la quatrième portion comme à la première sont ajoutés 2 cm³ d'eau neutre, le pH est 9,00 de cette portion ; une partie est conservée pour des études ultérieures, l'autre partie sert à l'analyse quantitative.

Les quatre portions sont parfaitement limpides (même celle dont le pH est 6,98), légèrement colorées en jaune-brun clair, leur teinte est comparable à celle obtenue en diluant du sérum frais par deux volumes d'eau.

Analyse immédiate de A⁹.

A 3 cm³ de la solution A⁹ sont ajoutés 50 cm³ d'alcool à 95° C., le mélange est porté à l'ébullition, le coagulum est séparé par centrifugation et traité à nouveau par de l'alcool à 90° C. bouillant, puis enfin épuisé à l'éther.

Le résidu insoluble dans l'alcool et l'éther pèse sec 96,0 mg. L'alcool et l'éther sont évaporés et les résidus bien desséchés sont repris par de l'éther anhydre ; de très petites quantités de sulfate d'ammonium insolubles sont éliminées par filtration (dans une atmosphère desséchée) sur tampon de coton dégraissé. Les solutions éthérées sont évaporées et leur résidus pesés :

Poids de l'extrait alcoolique après reprise par l'éther anhydre : 56,0 mg.

Poids de l'extrait éthéré après reprise par l'éther anhydre : 9,9 mg.

Le résidu insoluble dans l'alcool et l'éther constitue donc 59,3 0/0 de l'ensemble des substances (autres que le sulfate d'ammonium) qui se trouvaient en solution dans les 3 cm³ de solution de A⁹. Ce résidu est amorphe, blanc, insoluble dans l'eau, l'analyse qualitative montre que c'est une substance organique

riche en carbone et en azote contenant un peu de soufre et de faibles traces de phosphore.

L'analyse quantitative par les méthodes de microanalyse de PREGL ⁽¹⁾ donne comme moyennes des résultats de trois analyses concordantes :

$$\text{N } 0/0 = 16,3 \quad \text{C } 0/0 = 47,0 \quad \text{H } 0/0 = 8,0$$

Quelques parcelles de cette substance mises :

1° En suspension dans de l'acide nitrique se colorent en jaune et la teinte vire à l'orangé par un excès d'ammoniaque ;

2° En suspension dans du réactif de MILLON bouillant se colorent en rouge brique.

Cette substance insoluble dans l'alcool chaud et dans l'éther est donc un coagulum protéidique et sa composition déterminée par la microanalyse est, aux erreurs d'expériences près, celle de la sérum albumine purifiée par trois cristallisations successives et précipitée par de l'alcool bouillant.

Un premier fait important est à noter : la fraction A⁹ séparée par fractionnement de l'ensemble des albumines du sérum ne contient que 39,3 0/0 d'albumine, mais 40,7 0/0 de substances solubles dans l'éther.

Pour chercher à connaître la nature de ces substances non protéidiques présentes en si grande proportion dans la fraction A⁹, l'analyse est conduite comme elle le fut pour la fraction A² (voir p. 39 et suivantes).

Contenu de 10 cm³ de la solution de A⁹ étudiée ci-dessus.

Substances totales en solution ⁽²⁾	0,3241 gr.
Protéides (secs)	0,1921 gr.
Substances solubles dans l'alcool-ester total.	0,1320 gr.
Phosphoaminolipides	0,0737 gr.
Cholestérol total.	0,0366 gr.
Acides gras totaux non phospholipidiques	0,0259 gr.

⁽¹⁾ PREGL. *Microanalyse organique quantitative*. Traduction française par WELTER, 1 vol., Paris, 1923. Les Presses universitaires de France, éditeur.

⁽²⁾ Dans ce chiffre ne sont pas comprises les petites quantités de sulfate d'ammonium naturellement présentes dans la solution.

Le poids moléculaire moyen des acides gras non phospholipidiques a été déterminé par titration, le chiffre trouvé est 271 ; en tenant compte de ce résultat on peut calculer la quantité d'acides gras nécessaire pour esterifier tout le cholestérol, pour 0,0366 de cholestérol il faut 0,0257 d'acides gras ; ce chiffre est remarquablement concordant avec celui trouvé pour les acides gras non phospholipidiques 0,0259. Cette concordance peut être due à l'absence de cholestérol libre et d'acides gras libres ou simplement à une pure coïncidence ; pour élucider ce fait l'expérience entière est refaite et, sur une nouvelle préparation de A⁹ provenant d'un autre cheval, le cholestérol libre est recherché dans la partie soluble dans l'acétone lors de la précipitation des phospholipides, et, comme il fallait s'y attendre, il n'apparaît qu'un précipité impondérable par addition de digitonoside ; il n'y a donc pas de cholestérol libre mais seulement des esters de cholestérol.

Dans la fraction A², une faible partie du cholestérol était à l'état libre, mais au cours des précipitations successives qui ont abouti à l'obtention de A⁹, le cholestérol non esterifié est resté dans les eaux-mères.

Ce fait est en parfait accord avec les courbes des rendements (p. 58) tracées lors de l'étude des fractions successives A¹, A², ..., Aⁿ. Ces courbes montrent en effet que, tandis que les acides gras contenus dans la fraction A³ sont ensuite presque quantitativement précipités dans les fractions A¹, A⁵, ..., Aⁿ, le cholestérol continue à s'éliminer dans les eaux-mères pour se fixer, plus tard seulement, à un taux constant.

En résumé A⁹ est constitué par :

Protéides	59,27 0/0
Phosphoaminolipides	22,74 0/0
Esters de cholestérol	17,90 0/0

et ne contient ni acides gras libres, ni glycérides, ni cholestérol libre en quantités notables. L'absence de sels biliaires en quantité notable permet d'éliminer toute action solubilisante de ces sels vis-à-vis des phospholipides, action constatée en 1908 par LONG et GEPHART (*loc. cit.*, cf. p. 3).

Extraction par l'éther des solutions de A.^{II} aux différents pH.

20 cm³ de chacune des trois premières solutions dont les pH sont respectivement 9,00, 8,52 et 6,98 (voir p. 69) sont introduits dans des boules à décanter avec 20 cm³ d'éther ; après agitation énergique, les boules sont laissées deux heures au repos, puis agitées à nouveau et les liquides aqueux soutirés après deux heures. Les solutions éthérées sont versées dans des fioles de Fourneau tarées, l'éther est chassé par ébullition au bain-marie, puis, dès la fin de l'ébullition de l'éther, les fioles sont placées dans des dessiccateurs à vide jusqu'à poids constant.

Les solutions aqueuses sont soumises dans des conditions identiques à deux autres épuisements par l'éther, mais les temps de contact sont augmentés et portés à douze heures.

Au cours de ces opérations aucun changement sensible ne se manifeste dans l'aspect des solutions qui restent parfaitement limpides.

Voici un tableau donnant les poids des substances extraites par l'éther.

	pH = 6,98	pH = 8,52	pH = 9,00
Après la 1 ^{re} extraction .	0 gr. 0020	0 gr. 0016	0 gr. 0010
Après la 2 ^e extraction .	0 gr. 0049	0 gr. 0035	0 gr. 0025
Après la 3 ^e extraction .	0 gr. 0054	0 gr. 0042	0 gr. 0030

Le chiffre des dixièmes de milligrammes n'est qu'approximatif car il est obtenu par appréciation avec une échelle graduée en demi-milligrammes.

Les 20 cm³ de solution soumis dans chaque cas à l'épuisement par l'éther contenaient :

89 mg. de cholestérol.
490 mg. d'acides gras.

Soient, au total, au moins 279 mg. de substances solubles dans l'éther et insolubles dans l'eau. Les proportions extraites par l'éther sont très faibles : après trois épuisements consécutifs

l'éther extrait seulement 1,9 0/0 des substances solubles dans l'éther dans le cas le plus favorable (pH 6,98) et 1,07 0/0 dans le cas le moins favorable (pH 9,00).

J. H. LONG et F. GEPHART ⁽¹⁾ ayant montré que les émulsions aqueuses de lécithine sont assez stables vis-à-vis de l'éther si l'eau ne contient pas d'électrolytes, mais très instables en présence de sels, l'extraction est poursuivie pour la fraction dont le pH est 6,98 après addition d'un volume égal de solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium. Après deux épuisements par 20 cm³ d'éther le poids de l'extrait éthéré est 0,7 mg. soit seulement 0,25 0/0 des substances solubles dans l'éther. Le phénomène constaté ici est donc d'un ordre très différent de celui des phénomènes constatés par LONG et GEPHART avec les émulsions de jaune d'œuf, de substance cérébrale et de lécithine pure dans l'eau et les solutions salines.

Il est impossible d'analyser séparément les substances extraites par l'éther aux différents pH ; les extraits sont donc réunis, leur poids total est 12,3 mg. Cet ensemble est mis en solution dans un petit volume d'éther, la solution est versée dans 10 cm³ d'acétone contenant un peu de chlorure de magnésium ; il n'apparaît pas de précipité ; or cette réaction est encore positive avec deux milligrammes de lécithine purifiée, dissous dans un même volume d'éther et traités par un même volume d'acétone.

Les dosages du phosphore, du cholestérol et des acides gras effectués sur des parties aliquotes de la solution acétonique donnent :

Phosphore	traces indosables
Cholestérol total (dosage colorimétrique)	environ 50 0/0
Acides gras totaux (par pesée)	environ 45 0/0

Ces résultats sont très imprécis par suite de la petitesse des prises d'essai, un fait certain s'en dégage cependant : la lécithine, présente en grande quantité dans A⁹ reste intégralement en solution aqueuse, même en présence de sels, et ne passe pas dans l'éther ; seules de très petites quantités de cholestérol ou d'esters cholestériques sont extraites par l'éther.

⁽¹⁾ J. H. LONG. *Am. chem. Soc.*, 30, pp. 881-895 (mai 1908) ; J. H. LONG et F. GEPHART, *Am. chem. Soc.*, 30, pp. 895-902 (mai 1908).

Pour vérifier si la seule présence de sérum-albumine conférerait aux émulsions aqueuses de lécithine la propriété de résister à l'épuisement par l'éther, deux émulsions de lécithine purifiée dans des solutions albumineuses ont été préparées comme suit :

La sérum-albumine utilisée provenait du même sérum de cheval, mais de la fraction B' qui était la plus pauvre en phosphore (0,03 0/0 de précipité trichloracétique). Cette solution, dialysée pour enlever le sulfate d'ammonium, fut diluée jusqu'à ce que son titre en albumine précipitable par l'alcool bouillant fût le double de celui de la solution de A^o, soit 0 gr. 192 pour 5 cm³.

Deux prises de 10 cm³ de cette solution furent amenées, l'une au pH 6,97, l'autre au pH 9,00 par des quantités de solutions d'acide ou d'ammoniaque titrées, calculées d'après des mesures préalablement sur des prises semblables de 10 cm³.

Les volumes furent ensuite complétés, par de l'eau neutre, à 20 cm³ dans les deux cas.

A chacune des solutions ainsi obtenues fut ajouté lentement, en agitant énergiquement, 1 cm³ d'une solution alcoolique de lécithine purifiée extraite d'un autre sérum de cheval. Le titre de cette solution était tel que la concentration finale en lécithine de l'émulsion aqueuse fut identique à celle trouvée plus haut pour A^o, soit 0 gr. 0368 pour 5 cm³.

Les solutions ainsi obtenues étaient franchement louches.

Aux 20 cm³ de A^o au pH 8,5 fut ajouté 1 cm³ d'alcool pour que toutes les conditions soient identiques, puis les trois solutions furent parallèlement soumises à l'épuisement par l'éther.

Après deux extractions étherées, la lécithine était quantitativement extraite des deux mélanges, mais la solution de A^o n'avait cédé que 1,2 0/0 des substances solubles dans l'éther qu'elle contenait.

Pour savoir si les propriétés de A^o étaient dues à une qualité particulière des lipides qui s'y rencontrent, 5 cm³ d'une solution assez concentrée de A^o de pH 6,97, sont traités par de l'alcool bouillant, le coagulum protéidique est épuisé dans un appareil de Soxhlet par de l'alcool bouillant, puis par de l'éther ; pour éviter toute oxydation ces opérations sont entièrement conduites dans une atmosphère d'anhydride carbonique. Les solutions alcooliques et étherées sont rassemblées, évaporées à sec à la température de 20° dans le vide, le résidu sec est repris par de

l'éther à 66°, la solution est filtrée pour enlever quelques cristaux de sulfate d'ammonium ; la solution étherée évaporée sous pression réduite laisse un résidu de 0 gr. 101 constitué par l'ensemble de toutes les substances solubles dans l'éther contenues dans les 3 cm³ de solution de A⁹ utilisés. Dans le flacon contenant ce résidu sont introduits 3 cm³ d'eau neutre, le flacon rempli d'azote est bouché et soumis à une agitation énergique et prolongée ; après deux heures on obtient une émulsion laiteuse dont après quelques minutes de repos se séparent d'abondants flocons qui se rassemblent à la surface ; il ne s'est donc pas formé une émulsion homogène stable. L'ensemble est laissé au repos jusqu'au lendemain, l'aspect n'a pas varié. L'addition d'ammoniaque en quantité suffisante pour ajuster le pH entre 7,5 et 8,5 (1) ne provoque pas non plus la formation d'une émulsion homogène même après 3 heures d'agitation énergique.

Il est donc nécessaire d'admettre que les lipides et stériles contenues dans A⁹ ne peuvent pas donner avec l'eau pure ou l'eau légèrement alcaline des émulsions homogènes. En ajoutant le sulfate d'ammonium qui a été retiré des 3 cm³ de A⁹ (voir ci-dessus) l'émulsion n'est pas plus homogène.

Pour étudier l'influence de la sérum-albumine sur les propriétés de ces émulsions, de la sérum-albumine cristallisée, provenant du même sérum de cheval, mais de la fraction B, est soumise à la dialyse pour enlever la presque totalité du sulfate d'ammonium, puis ajoutée à l'émulsion en quantité telle que le rapport $\frac{\text{protéides}}{\text{extrait étheré}}$ soit le même que dans A⁹. Dans ces conditions, et quelle que soit la concentration des ions hydrogènes, il est encore impossible d'obtenir une émulsion homogène.

La suspension grossière ainsi obtenue (pH 8,3) est mise dans une boule à décanter avec 10 cm³ d'éther ; après plusieurs agitations l'ensemble est laissé en repos 36 heures, puis l'éther est séparé par décantation et remplacé par un égal volume d'éther neuf ; après 48 heures l'éther est de nouveau séparé et remplacé ; après 24 heures enfin l'ensemble des solutions étherées est rassemblé et l'éther est évaporé, le résidu desséché dans le

(1) Simple détermination du pH à la touche sur papier à la phénol-sulfone-phtaléine.

vide en présence d'acide sulfurique jusqu'à poids constant pèse 0 gr. 112.

Parallèlement une quantité égale d'albumine de même provenance, épuisée par l'éther, avait fourni un extrait éthéré sec pesant 0 gr. 013.

Conclusion. — L'éther a quantitativement enlevé de l'émulsion albumineuse toutes les substances introduites. Or on a vu (p. 73) que dans des conditions semblables l'éther n'enlève que des traces de substances à une quantité correspondante de A^o qui contenait cependant les mêmes substances en quantités identiques.

Il ne semble pas que l'on puisse imputer cette dissemblance à une différence de nature des phospholipides et des stérines puisque ce sont identiquement les mêmes dans les deux cas et que toutes les précautions possibles ont été prises pour éviter toute oxydation (atmosphère inerte) et toute hydrolyse ou alcoololyse (pH 6,97).

Peut-être doit-on rapporter ce phénomène à une différence de nature entre les protéides de A^o et de B mais ceci ne peut pas être vérifié, car il a été impossible d'obtenir les protéides de A^o, débarrassés des lipides, autrement qu'à l'état de coagulum insoluble. L'analyse élémentaire quantitative n'a révélé aucune différence appréciable entre les coagulums obtenus par action de l'alcool chaud à partir des fractions A^o et B, mais ce résultat ne permet naturellement pas de conclure à l'identité de ces protéides.

Peut-être est-il aussi logique de penser à une différence d'état des lipides de A^o et de l'émulsion préparée *in vitro*. Différence d'état physique indiscutable (A^o est limpide, l'émulsion au contraire n'est qu'une grossière suspension instable) mais peut-être aussi, différence d'état chimique, tenant à l'existence possible de liaisons chimiques entre protéides et lipides.

En éliminant toute hypothèse il faut cependant retenir des faits importants qui peuvent se résumer ainsi :

1° A^o donne dans l'eau des solutions parfaitement limpides avec la plus grande facilité même en milieu rigoureusement neutre (pH 6,97). Lorsque la concentration en A^o est suffisante on obtient des gelées parfaitement limpides également ;

2° L'éther n'enlève que d'infimes traces de substances aux solutions de A^o ;

3°. Les lipides extraits de A° par l'alcool bouillant ne donnent avec l'eau, même en présence d'albumine, et quelle que soit la réaction du milieu, que des suspensions grossières et instables ;

4°. De ces suspensions albumineuses l'éther froid extrait quantitativement les lipides avec grande facilité (trois épuisements).

Pour savoir si les liaisons retenant les lipides dans le milieu aqueux et les protégeant de l'extraction éthérée ne se forment pas au cours des précipitations acides, une nouvelle émulsion de lipides provenant de A° est préparée avec de l'albumine cristallisée provenant de B, l'ensemble est acidifié à pH 3,7, puis, après quelques heures, alcalinisé à pH 8,3 par de l'ammoniaque, laissé en repos quelques heures, acidifié à nouveau et finalement alcalinisé et dialysé pour enlever la majeure partie du sulfate d'ammonium. Cette émulsion est aussi peu homogène qu'avant toutes ces opérations et l'éther enlève aussi quantitativement les lipides.

MAYER et TERROINE ⁽¹⁾ avaient pensé que certaines du moins des lécithalbumines préparées autrefois devaient leurs propriétés à la simple action de l'acidité sur les mélanges d'albumine et de lécithine : « Les lécithalbumines sont toujours formées en milieu acide » disent-ils. Il ne semble pas que ce soit le cas ici.

(1) MAYER et TERROINE (1907). *Soc. de biologie*, t. LXII, p. 398.

Action de l'alcool sur A⁹.

L'étude de l'action de l'alcool sur A² faite dans un chapitre précédent (pages 30 et suiv.) a révélé quelques faits intéressants. Pour voir si des faits de même ordre se présentent avec les produits ultimes du fractionnement, cette étude a été reprise avec la fraction A⁹.

Les solutions utilisées pour cette étude sont des portions de celles préparées précédemment pour l'étude de l'extraction étherée (voir page 69). Leurs concentrations étaient identiques, mais leurs pH étaient différents : 6,98, 8,51 et 9,00.

Avec chacune de ces trois solutions sont préparés cinq mélanges permettant d'étudier simultanément : 1° l'influence du pH ; 2° l'influence de la concentration en alcool ; 3° l'influence de la concentration en A⁹.

1 ^{er} tube : 3 cm ³ de solution de A ⁹ + 60 cm ³ d'alcool à 96° C.	
2 ^e tube : 3 cm ³ — + 30 cm ³ —	
3 ^e tube : 3 cm ³ — + 15 cm ³ —	
4 ^e tube : 3 cm ³ — + 5 cm ³ —	
5 ^e tube : 1 cm ³ de solution de A ⁹ + 2 cm ³ d'eau + 30 cm ³ d'alcool à 96° C.	

L'alcool était versé rapidement dans le tube agité constamment, puis, après agitation énergique, les tubes étaient laissés au repos à la température de + 12° et examinés de temps en temps.

Pour A⁹, les phénomènes constatés, lors de l'addition de l'alcool, sont de même ordre que pour A², plus nets cependant.

1° Apparition instantanée d'un précipité amorphe dans le cas de solutions pas assez alcalines ou trop concentrées.

2° Précipitation très tardive ou nulle lorsque les solutions sont suffisamment alcalines ou suffisamment diluées et que le titre final de l'alcool est assez élevé.

3° Apparition plus ou moins rapide suivant les cas, d'aiguilles cristallines d'esters cholestériques ; mais tandis que pour A² il était impossible d'obtenir ces aiguilles sans qu'au préalable se précipitent des protides, pour A⁹, on voit, dans certaines condi-

tions ⁽¹⁾ apparaître, assez rapidement, de splendides aiguilles visibles à l'œil nu sans que le microscope puisse révéler la présence d'aucun précipité amorphe.

4° Lorsque l'action de l'alcool se prolonge, et d'autant plus rapidement que l'alcalinité de la solution est plus faible, la précipitation se termine ; au fond du tube se rassemblent deux précipités différents : d'une part, un coagulum protéidique contenant la totalité des protéides de la solution, et, d'autre part, un précipité cristallin d'esters cholestériques. Le liquide surnageant devient parfaitement limpide. Tant que la précipitation n'est pas terminée le liquide surnageant est plus ou moins opalescent ou louche et présente généralement des moires à l'agitation.

Pour les tubes 1 et 2 à pH 8,5 et pour les tubes 2 et 3 à pH 9,0 la terminaison des précipitations est très tardive et nécessite une à quatre semaines. Le tube 1 à pH 9 ne présentait encore aucun coagulum protéidique après deux mois à la température du laboratoire.

A une température inférieure à + 5° C. la stabilité des solutions est encore bien plus grande et des tubes tels que 1, 2, 3 et 5 à pH 9 peuvent se conserver des mois sans qu'apparaisse un coagulum protéidique.

Les concentrations en albumine ne sont cependant pas négligeables, 1 cm³ de la solution de A⁹ contient, on l'a vu, 19 mgr. 2 d'albumine pesée à l'état sec après précipitation par l'alcool bouillant et épuisements par l'alcool bouillant et l'éther. Le tube 3 à pH 9 contient 57 mgr. 6 d'albumine en solution stable dans 33 cm³ d'alcool à 87° C. environ, soit 1 gr. 75 par litre.

Dans des conditions semblables de pH et de concentration en alcool, mais en partant d'une solution plus concentrée en A⁹, il a été possible d'obtenir une solution alcoolique encore plus concentrée en albumine contenant 2 gr. 3 environ d'albumine sèche par litre ; cette solution soumise à une centrifugation prolongée à 6.000 tours à la minute ne laissait pas se déposer autre chose que des aiguilles de stériles.

Dans toutes les solutions alcooliques chauffées vers 70° apparaît un coagulum protéidique, mais il faut chauffer à l'ébullition

(1) Tubes n° 2 à pH 8,5 et à pH 9,0 — après une heure et demie environ les aiguilles sont visibles à l'œil nu et mesurent déjà près de 1 millimètre, elles s'accroissent par la suite jusqu'à 2 ou 3 millimètres.

pendant dix minutes environ pour que la coagulation des protéïdes soit totale. Si l'on refroidit rapidement l'alcool dès l'apparition du coagulum, puis qu'on sépare le précipité par centrifugation, il apparaît encore un coagulum dans le liquide si on le porte à l'ébullition.

5° Comme dans le cas de A² mais plus nettement encore, on voit, en versant lentement l'alcool dans les solutions de A³, apparaître un précipité amorphe qui se redissout progressivement dans l'excès d'alcool (si toutefois le pH est suffisamment élevé pour permettre cette redissolution).

Voici un tableau résumant les phénomènes constatés au cours de ces expériences :

Contenu des tubes			pH = 6,98	pH = 8,54	pH = 9,00
Solution de A ⁹	Eau	Alcool à 96° C.			
<i>Aspect dès le mélange.</i>					
3 cm ³	0 cm ³	60 cm ³	très louche, moires	louche léger, belles moires	louche très léger, moires
3 »	0 »	30 »	précipité abondant, surtout amorphe, quelques aiguilles microscopiques	pas de précipité, très belles moires	pas de précipité, moires
3 »	0 »	15 »	précipité abondant	précipité fin en suspension	précipité très fin en suspension
3 »	0 »	5 »	précipité abondant, amorphe	précipité abondant, amorphe	précipité abondant, amorphe
4 »	2 »	30 »	pas de précipité, opalescence, moires	pas de précipité, faible opalescence, légères moires	limpidité parfaite, pas de moires
<i>Aspect après une heure.</i>					
3 cm ³	0 cm ³	60 cm ³	quelques flocons de coagulum amorphe, liquide trouble	pas de précipité, belles moires	pas de précipité, opalescence légère, quelques moires
3 »	0 »	30 »	précipité amorphe rassemblé au fond du tube surmonté d'un feutrage d'aiguilles	pas de précipité amorphe mais de très belles aiguilles, moires	pas de précipité amorphe, très belles aiguilles
3 »	0 »	15 »	précipité amorphe rassemblé surmonté d'un feutrage d'aiguilles	précipité fin en suspension	louche, moires

1 »	2 »	30 »	quelques flocons de coagulum, amorphe	pas de précipité, faible opalescence, légères moires	limpidité parfaite
<i>Aspect après cinq heures.</i>					
3 cm ³	0 cm ³	60 cm ³	quelques flocons, liquide louche, moires abondantes	pas de précipité, belles moires	pas de précipité, assez belles moires
3 »	0 »	30 »	sans changement	pas de précipité amorphe, très belles aiguilles, moires	pas de précipité amorphe, très belles aiguilles, moires
3 »	0 »	45 »	sans changement	traces de précipité amorphe au fond du tube, belles aiguilles	sans changement, pas d'aiguilles
3 »	0 »	5 »	sans changement	sans changement	sans changement
4 »	2 »	30 »	coagulum rassemblé au fond du tube, liquide surnageant limpide	pas de précipité, moires, faible opalescence	limpidité presque absolue, pas de moires
<i>Aspect après quarante-huit heures.</i>					
3 cm ³	0 cm ³	60 cm ³	précipité amorphe surmonté de rares aiguilles, quelques moires	trace de précipité, moires légères	sans changement
3 »	0 »	30 »	précipitation terminée, liquide surnageant limpide	peu de précipité amorphe, aiguilles, liquide louche, moires	toujours pas de précipité amorphe, aiguilles splendides
3 »	0 »	45 »	précipitation terminée	précipitation terminée	trace de précipité amorphe, pas d'aiguilles, moires belles
3 »	0 »	5 »	sans changement	sans changement	sans changement
4 »	2 »	30 »	précipitation terminée	précipitation terminée	opalescence légère, rares moires

Si l'on ajoute progressivement de l'alcool dans une solution de A⁹, il apparaît un précipité qui se dissout ensuite plus ou moins dans l'excès d'alcool.

Cette observation nous a conduit à essayer l'action de petites quantités d'alcool et dans ce but ont été préparés les tubes n° 4 contenant seulement 5 cm³ d'alcool pour 3 cm³ de solution de A⁹; quel que soit le pH la précipitation est, dans ces conditions, instantanée.

Il est à remarquer que ce précipité apparaissant par de petites quantités d'alcool est toujours amorphe et qu'il se redissout si on ajoute assez d'alcool; ce n'est que tardivement que dans la solution ainsi obtenue se forment les aiguilles.

Quelle est la nature de ce précipité ?

Pourquoi suffit-il d'une petite quantité d'alcool pour qu'il apparaisse, alors qu'il se dissout dans un excès d'alcool ?

Voici quelques expériences complémentaires effectuées dans le but de chercher les réponses à ces questions :

1° Si à 3 cm³ de solution de A⁹ on ajoute brusquement 3 cm³ d'alcool à 96° C., il se forme un abondant précipité, et, si instantanément on verse dans le tube 50 cm³ environ d'eau neutre, le précipité se dissout intégralement, la solution est à peine opalescente ;

2° Si l'on agit plus lentement et qu'on laisse en contact l'alcool et le précipité avant d'ajouter l'eau, la dissolution du précipité est moins complète, le liquide est fortement opalescent ou louche suivant le temps de contact avec l'alcool ;

3° En employant un peu plus d'alcool, 6 cm³ par exemple pour 3 cm³ de solution de A⁹, il faut agir très vite pour que la dissolution dans l'eau soit à peu près totale, quelques secondes de contact entre l'alcool et le précipité suffisent pour que la solution aqueuse finale soit louche ;

4° Moins la solution utilisée est alcaline, plus il faut agir vite pour que la solution finale soit limpide ;

5° Si après avoir obtenu un précipité par l'action de peu d'alcool on dilue non plus avec de l'eau, mais avec de l'alcool, il n'est plus indispensable d'opérer aussi vite pour obtenir la dissolution. Si cependant on laisse le précipité plusieurs heures en contact avec l'alcool, la redissolution n'est plus tout à fait complète, il reste quelques aiguilles et de très petites quantités de précipité amorphe insolubles.

Conclusions. — Il y a donc dénaturation même par peu d'alcool, mais en opérant rapidement la dénaturation est très peu avancée, et la dissolution dans l'eau complète.

La dénaturation est très rapide si la solution est acide, moins rapide en milieu alcalin.

Après une heure, la dénaturation est assez avancée et cependant le précipité se dissout dans un excès d'alcool tout aussi bien qu'au début. La dissolution dans l'excès d'alcool n'étant pas influencée par le début de la dénaturation, les produits de la dénaturation commençante sont solubles dans l'alcool fort.

Les solutions aqueuses obtenues par dissolution du précipité alcoolique avant toute dénaturation présentent toutes les propriétés et l'aspect de solutions diluées de A^0 .

Les précipités obtenus par peu d'alcool contiennent en abondance du phosphore, des acides gras et du cholestérol. Les précipités protéidiques apparaissant au contraire tardivement dans les mélanges riches en alcool ne contiennent pas de phosphore ou seulement d'infimes traces. Ils ne contiennent pas non plus d'acides gras ni de cholestérol (si ce n'est à l'état de cristaux de stériles qu'enlève facilement l'éther froid).

Etude de quelques propriétés des sols, des gels et des gliodes de A^0 .

A. Sols. — Les sols de A^0 sont miscibles en toute proportion avec l'eau neutre ou alcaline ou même légèrement acide à condition que l'acidité résultante ne soit pas assez forte pour flocculer A^0 ; soumis à la dialyse les sols de A^0 restent parfaitement limpides.

B. Gels. — Il est possible d'obtenir des gels de A^0 ; pour cela le précipité obtenu à pH 3,7, bien essoré, est additionné d'une solution d'ammoniaque trois fois normale en quantité juste suffisante pour alcaliniser très légèrement, puis l'ensemble est trituré avec un agitateur jusqu'à consistance de pâte et laissé au repos. Le lendemain on constate la formation d'un gel ferme parfaitement limpide.

Le gel ainsi obtenu présente des propriétés assez particulières :

1° si on le brise en plusieurs fragments avec un agitateur, les morceaux se soudent et après une heure il est impossible de retrouver la trace des coupures.

2° Si l'on recouvre le gel d'une couche d'eau neutre, le gel se gonfle un peu, mais ne se dissout qu'avec une extrême lenteur, il faut parfois plus de deux jours pour que le gel se disperse en sol. Par agitation répétée on active beaucoup la disparition du gel qui se termine en une heure ou deux.

3° Si la solution environnant le gel est très légèrement acide ou trop saline, la transformation du gel en sol est presque interminable, mais on constate des variations de volume du gel plus ou moins importante suivant la composition de la solution.

C. Gliodes. — En faisant dissoudre A° dans une solution un peu plus diluée d'ammoniaque (2N par exemple) en quantité suffisante pour neutraliser, on n'obtient plus un gel, il se forme une masse visqueuse répondant en tous points à la définition du gliode de BOTTAZZI ⁽¹⁾.

Si l'on recouvre d'eau neutre ce gliode, on constate qu'il forme une phase indépendante, l'agitation ne provoque pas sa dispersion immédiate en sol et les parcelles séparées par l'agitation se rassemblent au fond du vase pour se souder à nouveau en un gliode analogue au primitif. La disparition de ce gliode est toujours assez lente, le gliode gonfle avant de se dissiper. Lorsque la solution environnante est très légèrement acide ou suffisamment saline, le passage à l'état de sol est très lent.

BOTTAZZI a fait ressortir les différences existant entre les substances colloïdales naturelles telles qu'elles se rencontrent dans les organismes et les substances colloïdales étudiées généralement par les physicochimistes : suspensions de substances minérales ou organiques, solutions de protéides plus ou moins dénaturés ou modifiés tels que gélatine, albumine dialysée et purifiée, etc. Toutes ces solutions renferment des submicrons visibles à l'ultra-microscope ; le protoplasme au contraire est optiquement vide et ne contient, entre les mitochondries, aucun submicron visible à l'ultra-microscope et présente seulement une luminescence diffuse à peine perceptible. La consistance du

(¹) BOTTAZZI. *Archivio di Scienze Biologiche*, vol. IV, nos 3 et 4 (1923).

protoplasme est, de plus, différente de celle des sols et gels colloïdaux, il présente l'aspect d'un mucus très visqueux, intermédiaire entre sols et gels, pas solide, mais cependant un peu élastique, pas liquide, mais coulant lentement. Par comparaison à la glu, BOTTAZZI a proposé le mot *gliode* pour désigner cette consistance et cet état physique.

Le gliode, comme un solide, peut être une phase indépendante du liquide ambiant.

Le globule rouge, sans noyau et sans membrane visible, peut être pris pour type de gliode : facilement déformable, il reprend sa forme par élasticité, il constitue une phase indépendante du plasma environnant, c'est un liquide très consistant.

Les protéides purifiés, cristallisés, dialysés, dépourvus des substances qui les accompagnaient dans les organismes ne donnent plus des gliodes, mais des sols et parfois des gels qui se montrent tous optiquement très hétérogènes. Dans le présent travail, nous avons par contre constaté que cette propriété de faire des gliodes limpides, qui disparaît habituellement par purification des protéides, persiste dans les fractions A^n riches en phospholipides et en stérols et s'y manifeste même de plus en plus nettement au fur et à mesure que s'enrichissent ces fractions en phospholipides et en stérols.

La fraction finale A^0 ne semble pas être un simple mélange d'albumine et d'impuretés diverses rassemblées au cours du fractionnement ; l'albumine semble y être combinée de façon encore indéterminée, chimique ou physique, avec un ou plusieurs des composés qui l'accompagnent et les liaisons entre les constituants de ce complexe sont assez fortes pour modifier sensiblement les propriétés physiques des constituants.

Le complexe est soluble dans l'eau en présence d'alcali en quantité suffisante pour neutraliser la solution, mais se précipite par addition de petites quantités d'acide suffisantes pour le libérer de ses combinaisons avec les cations.

Le complexe est, de plus, insoluble dans l'alcool et précipite par addition de quantités d'alcool suffisantes pour que le titre alcoolique devienne supérieur à 40° environ, mais à cette précipitation s'ajoute une autre action de l'alcool, la dénaturation, d'autant plus rapide que le titre alcoolique est plus élevé, d'autant plus rapide également que l'alcalinité du milieu est

moins grande. Cette dénaturation se faisant par étapes, forme d'abord des composés solubles dans l'alcool fort, puis, plus ou moins rapidement, ces substances se dénaturent à leur tour en libérant finalement : 1° des esters cholestériques peu solubles dans l'alcool froid, 2° un coagulum protéidique insoluble dans l'alcool et dans l'eau et 3° de la lécithine restant en solution alcoolique avec une partie des stérides.

En faveur de cette hypothèse plaident les faits suivants :

1° Au cours des précipitations successives qui ont permis d'obtenir la fraction A², on voit toutes les courbes représentant les variations des teneurs des diverses fractions en leurs différents constituants tendre vers une limite.

Il serait difficile d'expliquer la limite trouvée pour la teneur en albumine si une partie de l'albumine n'était pas retenue par une liaison quelconque aux substances précipitées dans les précipitations successives. En partant de la solution de l'ensemble des albumines du sérum on élimine par quelques précipitations de très grandes quantités d'albumine, puis l'albumine non éliminée se précipite quantitativement dans les précipitations ultérieures : il y a certainement une différence d'état ou de nature entre l'albumine s'éliminant si facilement et celle ne s'éliminant jamais.

2° Les deux tiers environ du cholestérol présent dans la fraction A s'éliminent assez rapidement, puis le dernier tiers est toujours précipité quantitativement : il faut aussi admettre pour ce cholestérol une liaison quelconque ou tout au moins un état différent.

3° L'éther, même en présence de quantités importantes de sels neutres, n'enlève pas la lécithine présente dans la solution de A² et n'enlève que des traces de stérides : la solution de A² n'est donc pas une simple émulsion de stérides et de lécithine.

4° L'alcool fort, ajouté dans des conditions déterminées, dissout l'albumine de la solution de A² : il faut donc que cette albumine soit dans un état particulier très différent de celui où se trouve la sérum albumine préparée par cristallisation à partir des fractions B¹ ou B² par exemple, que précipite quantitativement l'alcool dans des conditions identiques.

5° La fraction A² peut être dissoute dans très peu d'eau pour donner une solution ou un gel parfaitement limpide et dans laquelle l'éclairage latéral ultramicroscopique ne révèle aucune

particule solide ; or de telles solutions ou gels-peuvent contenir jusqu'à 130 grammes par litre de composés autres que l'albumine, tous insolubles dans l'eau. Ces solutions traversent péniblement, mais sans changement appréciable, les filtres les plus serrés et même la terre poreuse des bougies de Chamberland.

6° Si à une solution alcaline de A⁹ on ajoute progressivement de l'alcool, il se forme un précipité abondant qui se dissout ensuite dans l'excès d'alcool. De la solution ainsi obtenue cristallisent plus tard des stériles ; il semble difficile d'expliquer comment ces stériles primitivement précipités se dissolvent en donnant une solution sursaturée ; il semble logique d'admettre qu'ils se sont dissous parce qu'ils étaient à l'état de combinaison plus soluble et que leur cristallisation ultérieure est due à la décomposition progressive de cette combinaison instable en milieu alcoolique.

7° Tant que la coagulation de l'albumine n'est pas terminée, la cristallisation des stériles ne l'est pas non plus, il faut que toute l'albumine soit dénaturée pour que le liquide devienne limpide et ne présente plus de moires révélant la présence de très fines aiguilles en suspension. Cette dénaturation peut durer des semaines ou des mois et la cristallisation des stériles se termine toujours aussi lentement que la dénaturation. Le phénomène n'est en rien comparable à la cristallisation d'une solution sursaturée, mais peut s'expliquer facilement d'après l'hypothèse énoncée ci-dessus : Le complexe en se dénaturant libère progressivement 1° des stériles qui cristallisent au fur et à mesure ; 2° des protéides dénaturés qui coagulent.

Quelle que soit l'hypothèse envisagée, il existe un fait d'intérêt biologique indéniable : Le sérum est d'une limpidité parfaite malgré sa forte teneur en phospholipides et en stériles. Par examen ultramicroscopique on ne rencontre dans le sang que quelques rares particules dénommées chylomicrons par GAGE et FISH ⁽¹⁾ ; grâce à une méthode de numération proposée par ces auteurs, A. KNUDSON et W. K. GRIGG ⁽²⁾ ont démontré qu'il n'existe aucun rapport entre le nombre des chylomicrons et les

⁽¹⁾ S. H. GAGE et P. A. FISH (1921). *Journ. amer. Vétérin. Médic. Assoc.*, 58, p. 384.

⁽²⁾ ARTHUR KNUDSON et W. K. GRIGG (1923). *Proceedings of the Society for experimental biology and medicine*, 20, p. 462-466.

teneurs du sang en acides gras totaux et en cholestérol ; il faut donc admettre que ces substances sont, en majeure partie, à l'état dissous ou tout au moins à l'état d'amicrons et non à l'état de simple émulsion.

Dans le présent travail il a été extrait du sérum de cheval une substance, constituée par des protéides, des phospholipides et des esters de cholestérol, donnant avec l'eau des solutions parfaitement limpides, même en milieu rigoureusement neutre ; ces solutions sont aussi pauvres en granules ultramicroscopiques que du blanc d'œuf frais. La solubilité dans l'eau du complexe albumine-phospholipides-stérides est telle qu'il est possible d'en dissoudre de très grandes quantités dans très peu d'eau pour obtenir des gels absolument limpides contenant plus de 100 grammes de lipides par litre. Comme toutes les opérations pratiquées pour extraire cette substance du sérum ont été effectuées à basse température et sans aucune action chimique brutale, on peut penser qu'elle préexiste dans le sérum.

Dans les protoplasmes existent de très notables quantités de phospholipides, de glycérides et de stérols libres ou éthérisés. M. JAVILLIER, ALLAIRE et Mlle ROUSSEAU ⁽¹⁾ ont indiqué récemment les teneurs en extrait alcoolétheré de certains tissus animaux et ces chiffres montrent que le tiers environ de la substance animale sèche est constitué par des substances solubles dans l'alcool ou l'éther ; le gliode protoplasmique est cependant limpide. Les mitochondries et les granulations lipoïdes de GUILLERMOND ⁽²⁾ (microsomes) ne sont pas assez abondantes pour expliquer à elles seules une telle richesse en extrait alcoolétheré. Certains lipides se trouvent donc peut-être dans le gliode protoplasmique sous une forme voisine de celle rencontrée dans le sérum : complexes protéides-phospholipides-stérides.

Pour pousser plus loin cette hypothèse un peu hardie, on peut se baser sur la grande affinité pour l'eau du complexe protéides-phospholipides-stérides et sur sa sensibilité à la réaction du milieu et aux sels neutres pour concevoir que dans les cellules, de

⁽¹⁾ M. JAVILLIER, ALLAIRE et Mlle ROUSSEAU. Phosphore nucléaire, bilans et rapports phosphorés au cours de la croissance. *Bul. Soc. chimie biologique*, tome IX, n° 7, p. 778 (1927).

⁽²⁾ A. GUILLERMOND (1921). Sur les microsomes et les formations lipoïdes de la cellule végétale. *C. R. Ac. des sciences*, tome CLXXII, p. 1676, juin 1921.

telles substances jouent peut-être un rôle très important dans les phénomènes d'imbibition. Les remarquables travaux de MAYER et SCHEFFER ⁽¹⁾ ont déjà mis d'ailleurs en évidence les rapports étroits qui existent entre les lipides, les stérols et l'imbibition des cellules et des tissus.

Peut-être aussi est-il possible d'entrevoir des rapports entre la consistance du protoplasme (gliode de BOTTAZZI) ⁽²⁾ et de tels complexes protéides-phospholipides-stérides qui donnent avec l'eau des gliodes coulants mais se comportant cependant comme une phase indépendante du liquide ambiant si la concentration saline et la réaction de ce liquide ambiant ne sont pas favorables à la dispersion du gliode en sol.

⁽¹⁾ A. MAYER et G. SCHEFFER. Recherches sur les constantes cellulaires. *Journal de physiologie et de pathologie générale*, 1914, p. 1 à 16 et 23 à 37.

⁽²⁾ F. BOTTAZZI (1923). *Archivio di Scienze biologiche*, volume IV, p. 424 (Sistemi colloidali dell'organismo vivente).

Étude du fractionnement des albumines du plasma sanguin.

La fraction A⁹ étudiée dans le chapitre précédant provenait de sérum de cheval obtenu par coagulation du sang. Pour savoir si une fraction semblable pouvait être obtenue à partir du plasma lui-même, sans coagulation préalable, l'étude a été reprise sur du plasma obtenu par centrifugation de sang de cheval rendu incoagulable par addition d'oxalate d'ammonium. Les résultats obtenus furent semblables à ceux obtenus avec le sérum ; le fractionnement fut simplement un peu plus lent et nécessita quelques précipitations supplémentaires pour parvenir à la constance des teneurs en phosphore, en cholestérol et en acides gras, toutes les courbes de purification furent semblables à celles obtenues en étudiant le sérum, mais les limites furent atteintes un peu plus tardivement. La fraction A¹¹ du plasma s'est montrée en tout point identique à la fraction A⁹ du sérum ; mais comme de légères différences se manifestent d'un cheval à un autre, il est impossible de conclure à une différence sensible entre les résultats obtenus pour cet unique essai sur le plasma et les résultats obtenus pour le sérum. Voici comme simple indication les résultats obtenus pour ce plasma :

Fraction	P. 0/0	Cholestérol 0/0	Ac. gras 0/0
A	0,23	5,5	7,1
A ¹	0,46	8,3	12,3
A ²	0,70	12,0	19,6
A ³	0,78	12,8	24,7
A ⁴	0,85	13,0	27,2
A ⁵	0,90	13,2	27,5
A ⁶	0,94	13,2	28,0
A ⁷	0,98	13,6	28,3
A ⁸	0,99	13,8	29,0
A ⁹	1,03	13,8	29,3
A ¹⁰	1,06	14,1	29,5
A ¹¹	1,11	14,0	29,8

Les chiffres trouvés pour A^9 du sérum sont, nous l'avons vu, 1,10, 14,2, 30,6 ; il diffèrent très légèrement de ceux trouvés ici pour A^9 du plasma, mais sont tout à fait comparables à ceux trouvés pour A^{11} (ou A^{10}) qui n'en diffèrent pas de quantités supérieures aux erreurs possibles d'expériences.

Il faut surtout noter que pour le plasma, l'ascension vers les limites est, au début, moins rapide que pour le sérum.

Quelques essais physiologiques.

Certains auteurs ayant soupçonné un rôle possible des phosphatides ou des stérols dans les phénomènes d'immunité, il nous a semblé intéressant de voir si le complexe lécithostéroprotéidique extrait des sérums thérapeutiques possédait à un degré quelconque le pouvoir anti du sérum dont il a été extrait.

RECHERCHE PRÉLIMINAIRE. — *Essais de toxicité des solutions du complexe lécithostéroprotéidique (pH 7,3)* A des cobayes normaux et adultes sont injectées des solutions de concentrations diverses en complexe lécithostéroprotéidique provenant de sérum de cheval normal et préparées aseptiquement ; aucun phénomène toxique n'a été constaté lors de l'injection, ni dans les jours suivants, même pour des doses massives ⁽¹⁾.

RECHERCHES SUR UN SÉRUM DE CHEVAL ANTIDIPHTÉRIQUE. — Un sérum thérapeutique, titré et très actif, préparé par les services des sérums de l'Institut Pasteur fut soumis au fractionnement ; les phénomènes constatés furent, dans leur ensemble, comparables à ceux observés pour les sérums de chevaux normaux.

Le fractionnement fut poussé jusqu'à l'obtention de la fraction A⁶, puis cette fraction fut dissoute dans un petit volume d'eau en présence de la quantité d'ammoniaque nécessaire pour amener le pH à 7,6, puis l'ensemble fut soumis pendant vingt-quatre heures à la dialyse, l'eau distillée extérieure au sac de collodion étant renouvelée constamment. La solution ainsi privée de la majeure partie des sels fut diluée jusqu'à un volume correspondant au volume primitif du sérum et additionnée de chlorure de sodium en quantité suffisante pour la rendre à peu

(1) Les injections n'ont jamais été répétées sur le même animal pour éliminer tout phénomène d'anaphylaxie possible, cette partie du problème est à l'étude et fera, je l'espère, l'objet de communications ultérieures.

près isotonique avec le sérum. Cette solution était parfaitement limpide et presque parfaitement incolore, son pouvoir antitoxique vis-à-vis de la toxine diphtérique fut recherché, chez le cobaye, et trouvé nul ⁽¹⁾.

Il ne faut pas, par une généralisation hâtive, conclure qu'il doit en être ainsi pour tous les sérums antitoxiques. Nous nous proposons de faire de semblables recherches sur d'autres sérums et de voir, en particulier, si le pouvoir d'agglutination vis-à-vis des bactéries antigènes persiste dans les solutions du complexe lécithostéroprotéidique.

⁽¹⁾ Nous prions, à ce sujet, M. LOISEAU, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, de bien vouloir trouver ici l'expression de nos remerciements pour les titrages de pouvoir antitoxique qu'il a bien voulu faire pour nous.

Résumé et rappel de conclusions.

Par une longue série de fractionnements, effectués en évitant toute action chimique ou physique brutale, il a été possible d'extraire du sérum et du plasma de chevaux normaux une substance constituée par :

- 1° Un peu moins de 60 0/0 de protéides ;
- 2° Près de 40 0/0 de lipides (phospholipides et stérides) ;
- 3° De petites quantités de cholestérol libre.

Malgré cette très haute teneur en lipides, cette substance est très soluble dans l'eau, même en milieu rigoureusement neutre. Cette solubilité dans l'eau est telle qu'il est possible d'obtenir des gelées parfaitement limpides contenant plus de 100 grammes de lipides par litre.

Les sols et gels ainsi obtenus sont stables ; l'éther ne leur enlève aucune quantité appréciable de lipides, même si le contact se prolonge pendant des semaines ; l'addition de sels neutres ne favorise pas l'extraction des lipides par l'éther.

L'alcool fort, ajouté en excès à des sols dilués ne précipite pas les protéides,

En se basant sur ces faits, fut émise l'hypothèse suivante que vinrent étayer de nombreuses constatations (cf. p. 87 et suivantes). Dans la substance ici extraite du sérum et du plasma, l'albumine, les phospholipides et les stérides ne sont pas à l'état de liberté, mais unis par des liaisons physiques ou chimiques, liaisons assez fortes pour modifier profondément les propriétés physiques des divers constituants, pas assez puissantes, cependant, pour résister à l'action d'agents énergiques (tels que l'alcool bouillant) qui peuvent séparer les constituants.

L'existence dans le plasma et le sérum d'une telle combinaison d'une partie des phospholipides et des stérides avec des protéides, rend compte de la limpidité parfaite de ces liquides pourtant si riches en lipides. Il faut cependant noter que tout le cholestérol n'est pas, dans le sérum, sous cette forme ; d'autres recherches sont encore nécessaires sur ce sujet.

Les solutions aqueuses très concentrées de la substance envisagée ici, présentent l'aspect de gelées visqueuses, parfaitement limpides, coulant très lentement et possédant une certaine élasticité, elles répondent donc en tout point à la définition du gliode de BOTTAZZI (cf. pp. 86 et suivantes). Ces gelées, mises en contact avec de l'eau se dispersent en sols avec un très grande lenteur ; cette dispersion est favorisée par les alcalis très dilués et très ralentie, au contraire, par les sels neutres.

Dans les solutions diluées de sels neutres, la dispersion du gliode en sol est à peu près interminable et dans ces conditions la gelée se comporte comme une phase distincte du milieu ambiant et se gonfle, se rétracte ou se dissout sous l'influence des variations de la composition de la solution saline.

Toutes ces propriétés se retrouvent dans les protoplasmes : consistance, très haute teneur en phospholipides et stériles, limpidité, pouvoir d'imbibition etc. J'ai donc été amené à envisager le rôle primordial de complexes de cet ordre dans l'état physique du protoplasme qui, comme l'a entrevu BOTTAZZI, ne serait pas « un simple sol colloïdal analogue aux sols synthétiques étudiés par la majorité des physicochimistes, mais un gliode de complexité bien plus grande », combinaison physique ou chimique d'eau, de protéides, de lipides, de stérils et de stériles.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
I. — ETUDE HISTORIQUE ET CRITIQUE	
Recherches antérieures sur les phosphoaminolipides du sang . . .	1
Propriétés physico-chimiques des émulsions aqueuses de phospho-aminolipides	2
Propriétés physico-chimiques des mélanges lécithine-protéides. . .	4
Recherches antérieures sur le cholestérol sanguin.	6
Propriétés physico-chimiques des mélanges de cholestérol et de lipides	11
 II. — ETUDE EXPÉRIMENTALE	
Recherches expérimentales sur les lipides, les stérols et les protéi- des du sérum et du plasma sanguin	16
Principe du fractionnement	18
Protocole d'une expérience de fractionnement	24
Etude particulière de la fraction A ²	29
Fractionnement de la fraction A ²	51
Etude particulière de la fraction A ⁹	69
Etude de quelques propriétés des sols, des gels et des gliodes de A ⁹ . .	85
Etude du fractionnement des albumines du plasma	92
Quelques essais physiologiques	94
Résumé et rappel des conclusions	96

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

1° Les toxines végétales.

2° Etude des acides gras, de leurs sels et de leurs esters au moyen des rayons X.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 13 novembre 1928.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

S. CHARLÉTY.

